



TITLE:

# 放射線等価係数を用いたヒト健康 リスク評価( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

佐々木, 克典

---

CITATION:

佐々木, 克典. 放射線等価係数を用いたヒト健康リスク評価. 京都大学,  
2011, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2011-09-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k16383>

RIGHT:

# 放射線等価係数を用いたヒト健康リスク評価

佐々木 克典



## 目次

<b>Chapter 1 序論</b>	<b>1</b>
1-1 はじめに	
1-2 放射線等価係数を用いたリスク評価	
1-3 本研究の目的	
1-4 本論文の構成	
参考文献	
<b>Chapter 2 ヒト正常骨髓細胞の最適培養条件の決定</b>	<b>6</b>
2-1 本章の目的	
2-2 フローサイトメトリー	
2-3 MPO	
2-4 実験方法	
2-4-1 試薬及び細胞	
2-4-2 細胞培養	
2-4-3 フローサイトメトリーを用いた細胞分化解析	
2-4-4 MPO 含有量の測定	
2-5 結果	
2-5-2 細胞培養	
2-5-3 MPO 含有量の測定	
2-6 考察	
参考文献	
<b>Chapter 3 染色体異常試験によるベンゼンの放射線等価係数の決定</b>	<b>13</b>
3-1 本章の目的	
3-2 ベンゼン及び放射線と白血病	
3-2-1 白血病	
3-2-2 ベンゼン及びその代謝物	
3-2-2-1 ベンゼン	
3-2-2-2 カテコール	
3-2-2-3 ヒドロキノン	
3-2-2-4 カテコールとヒドロキノンの複合曝露	
3-2-3 放射線	
3-2-3-1 電離放射線と X 線	
3-2-3-2 電離放射線の健康影響	



- 3-3 白血病と染色体異常
- 3-4 実験方法
  - 3-4-1 試薬及び細胞
  - 3-4-2 曝露処理
  - 3-4-3 染色体標本の作製
  - 3-4-4 染色体標本の観察
- 3-5 結果
  - 3-5-1 細胞毒性試験
  - 3-5-2 染色体異常試験
- 3-6 ベンゼン及び代謝物の放射線等価係数の決定
- 3-7 考察
- 参考文献

## **Chapter 4 放射線等価係数を用いたベンゼン誘発白血病リスクの評価**

**31**

- 4-1 本章の目的
- 4-2 PBPK モデルを用いたベンゼン代謝物の内部曝露評価
  - 4-2-1 本章で用いた PBPK モデルの概要
  - 4-2-2 パラメータ設定
  - 4-2-3 モデルの妥当性の検証
  - 4-2-4 内部曝露量計算結果
- 4-3 ベンゼン誘発白血病リスクの評価
- 4-4 考察
- 参考文献

## **Chapter 5 マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析**

**42**

- 5-1 本章の目的
- 5-2 遺伝子変異と白血病
- 5-3 化学物質のリスク評価における個人差の取り扱い
- 5-4 マイクロアレイ
- 5-5 実験方法
  - 5-5-1 試薬及び細胞
  - 5-5-2 曝露処理
  - 5-5-3 RNA 抽出及び純度検定
  - 5-5-4 RNA のラベル化
  - 5-5-5 ハイブリダイゼーション
  - 5-5-6 遺伝子発現量の数値化

## 5-6 結果

### 5-6-1 実験系の再現性の確認

#### 5-6-1-1 RNA の抽出及び純度検定

#### 5-6-1-2 ラベル化による Cy3-CTP 取り込み効率計算結果

#### 5-6-1-3 サンプル間の類似性の検討

### 5-6-2 白血病マーカー候補遺伝子群の探索

#### 5-6-2-1 カテコール曝露と $\gamma$ 線照射に共通する発現変動遺伝子群の抽出

#### 5-6-2-2 パスウェイ解析

### 5-6-3 遺伝子発現変動解析結果に基づく個人差の定量評価法の提案

#### 5-6-3-1 本章で提案する評価法の概要

#### 5-6-3-2 評価結果

## 5-7 考察

### 5-7-1 白血病マーカー候補遺伝子群の探索

### 5-7-2 遺伝子発現変動解析結果に基づく定量評価法の提案

## 5-8 本章のまとめ

## 参考文献

## Chapter 6 二次元電気泳動を用いたタンパク発現変動解析

64

### 6-1 本章の目的

### 6-2 タンパク質と白血病

### 6-3 二次元電気泳動

### 6-4 実験方法

#### 6-4-1 試薬及び細胞

#### 6-4-2 曝露処理

#### 6-4-3 タンパク質の抽出及び精製

#### 6-4-4 二次元電気泳動

#### 6-4-5 特異タンパク質の同定

### 6-5 結果

#### 6-5-1 サンプル間の類似性の検討

#### 6-5-2 発現変動解析

### 6-6 考察

## 参考文献

## Chapter 7 放射線等価係数の適用可能性に関する考察

75

### 7-1 本章の目的

### 7-2 本研究で提案するリスク評価の概要

### 7-3 放射線等価係数を用いたアクリロニトリル誘発肺がんリスク評価

#### 7-3-1 アクリロニトリルとその健康影響

#### 7-3-2 本評価法の概要

#### 7-3-3 PBPK モデルを用いたアクリロニトリルの体内動態評価

##### 7-3-3-1 構築した PBPK モデルの概要

##### 7-3-3-2 パラメータ設定

##### 7-3-3-3 肺組織中濃度計算結果

#### 7-3-4 放射線等価係数の決定

#### 7-3-5 アクリロニトリル誘発肺がんリスク評価

### 7-4 放射線等価係数を用いた DDT 誘発肝臓がんリスク評価

#### 7-4-1 DDT とその健康影響

#### 7-4-2 本評価法の概要

#### 7-4-3 PBPK モデルを用いた DDT の体内動態評価

##### 7-4-3-1 構築した PBPK モデルの概要

##### 7-4-3-2 パラメータ設定

##### 7-4-3-3 モデルの検証

##### 7-4-3-4 肝臓中濃度計算結果

#### 7-4-4 放射線等価係数の決定

#### 7-4-5 DDT 誘発肝臓がんリスク評価

### 7-5 放射線等価係数の適用可能性についての考察

### 参考文献

## Chapter 8 結論

101

### 8-1 本研究の結論

### 8-2 今後の課題と展望

### 参考文献

### 謝辞

# Chapter 1 序論

## 1-1 はじめに

科学技術の発展に伴い、人類は様々な化学物質を開発し、その活動に役立ててきた。現在も次々と新規化学物質が開発されており、今や化学物質の総数は1千万種を超えており、生産、利用されている化学品だけでも数万種を数える。これらの化学物質は人類に限りない便益をもたらすものであるが、その一方で生物に対して有害なものも数多く存在する。現存する化学物質の内その有害性が既に評価されている物質はごく一部であり、化学物質の有害性、すなわちリスクを迅速に評価して規制の必要性等を判断することは現代生活の安全性、利便性を守るために必要不可欠である。また、膨大な数の化学物質のリスクを統一した尺度で評価して順位付けすることで、人々の安全な生活を守るために優先して取るべき対策を明確にすることができる。

ここで、有害化学物質に関する従来のヒト健康リスク評価法の概要を図1-1に示す。ヒトに対する曝露量と発症率とを結びつける用量-反応関係の特定には、ヒト集団に対する疫学調査を用いるのが最も信頼性が高いと言えるが、既存の疫学情報の量は化学物質の膨大さに対してあまりに少ないばかりか、疫学調査は対象とする悪影響が顕在化した後（あるいはしつつある際）にしか行えないため、新規化学物質のリスク評価には適用できない。従って定量的なリスク評価は、ほとんどの場合大規模な動物実験の結果をヒトへと外挿することで行われる。ヒトへの外挿の際に実験動物とヒトとの種差に基づく不確実性を伴うとはいえ、動物実験は一通りの生体機能を備えた実験動物における有害性を解析できるために非常に有効な手段である。しかしながら動物実験には多大なる費用、そして時間が必要となるため、数多くの化学物質全てについて大規模な動物実験を行うことは現実的でない。加えて大量の動物を犠牲にすることへの非難傾向は年々強まっており、*in vitro* 毒性試験等の代替手法に基づく、迅速かつ実用的な予見的リスク評価の枠組みを開発することが強く望まれている。この枠組みを適用することで、従来は困難であった、疫学情報や動物実験データの存在しない大多数の化学物質についてヒト健康リスクを評価することが可能となる。また、現在リスク評価は、従来の公害に代表される行政による事後的な規制のためのリスク評価から、各生産者による開発と同時並行の説明責任としてのリスク評価への転換期を迎えており、こうした側面からも、迅速かつ実用的な予見的リスク評価の開発は必要不可欠であると言える。

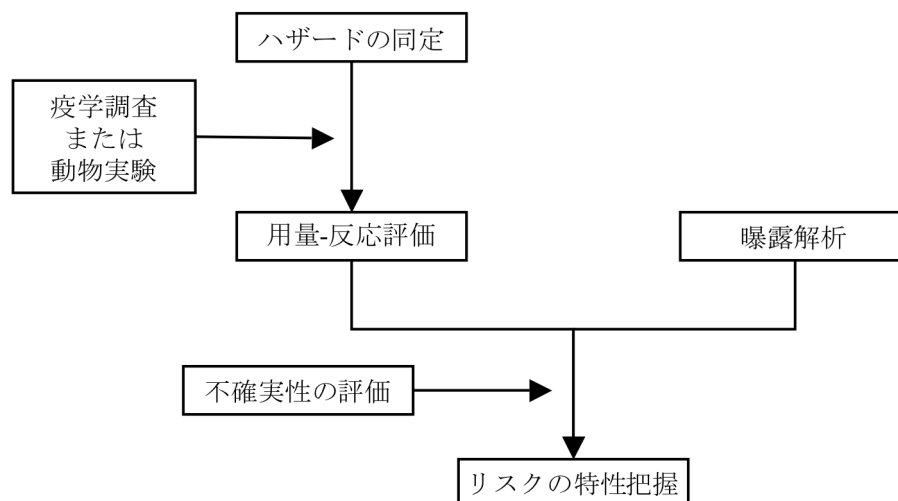


図 1-1 従来のヒト健康リスク評価法の概要

## 1-2 放射線等価係数を用いたリスク評価

以上のような背景を受け、著者は、放射線等価係数（REC: Radiation Equivalent Coefficient）という概念を用いたリスク評価法を提案する。ここで、放射線等価係数を、化学物質の毒性と放射線の毒性とを比較することで化学物質の曝露量をそれと等価な毒性を示す放射線量に換算する換算係数と定義する。放射線の健康影響に関しては、広島、長崎における原子爆弾投下直後より膨大な疫学調査データ、すなわちヒトに対する線量-反応関係に関する知見が蓄積されており、それに基づいて決定されたヒト健康リスク評価値は最も信頼性の高い指針であると言える。従って、簡単な *in vitro* 毒性試験の結果に基づいて放射線等価係数を設定することができれば、大規模な動物実験に伴う莫大な費用、時間、動物の犠牲を大幅に減らすことができ、また、実験動物からヒトへの外挿による不確実性の多くを回避した信頼性の高いリスク評価が可能になると考えられる。一方、本評価法は *in vitro* 毒性試験の結果に基づいてリスク評価を行うため、実験条件に基づく不確実性や *in vitro* と *in vivo* との乖離に起因する不確実性が生じることが予想されるが、疫学情報を有する放射線をいわば内標準として用いることで、そうした不確実性を最小化できると考える。

本研究で提案する放射線等価係数を用いたリスク評価法の概要を図 1-2 に示す。まず、曝露評価として、PBPK モデル（physiologically-based pharmacokinetic model：生理学的薬物動態モデル）を用いて対象物質の外部曝露量（経口摂取量、経気道摂取量、経皮吸収量など）を内部曝露量（対象臓器中濃度）へと変換する。その一方で、用量反応評価として、同一のバイオマーカーを対象とする *in vitro* 毒性試験により得た対象物質、放射線それぞれの用量反応関係を比較することで対象物質の放射線等価係数を決定する。得られた内部曝露量と放射線等価係数とを組み合わせることで、対象臓器における等価放射線量が計算できる。ここに放射線の疫学データを適用することで化学物質の健康リスクを算出する。以上の枠組みにより、化学物質の健康リスクを、その疫学情報や大規模な動物実験の結果に頼らずに評価するわけである。

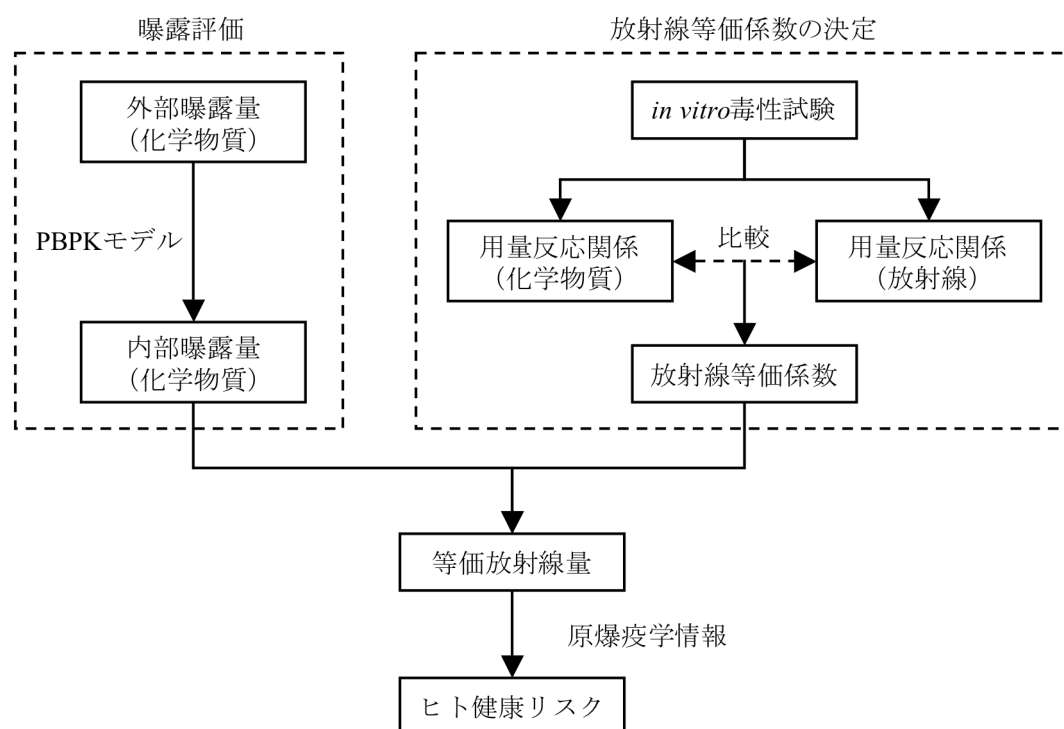


図 1-2 放射線等価係数を用いたリスク評価法の概要

### 1-3 本研究の目的

本研究で提案する放射線等価係数を用いたリスク評価法を確立して実用化するためには、その妥当性を十分に検証し、適用範囲や限界を明らかにすることが必要不可欠である。そこで本研究ではまず、ヒトに関する疫学情報が比較的豊富に存在するベンゼンを対象物質として選定し、その白血病リスクを評価して本評価法の妥当性を検証することを目的とした。ここで、ベンゼンは放射線と同様に白血病を誘発することが知られており、その毒性に関しては Pliofilm™ コホート研究に代表される大規模な疫学情報が蓄積されているため、放射線等価係数によるリスク評価の結果を既存の疫学情報と比較することで評価の妥当性が検証できる。

ベンゼンの放射線等価係数を決定するにあたっては、エンドポイントである白血病と強く関連し、ベンゼン及び放射線両者に共通の指標たり得る指標を対象とした *in vitro* 毒性試験を行うことが重要であり、本研究では評価指標として染色体異常に着目した。染色体異常は発がんの根源事象の一つに挙げられており、特に白血病発症機構と密接に関連すると考えられており、種々の白血病特異的な染色体異常が報告されている[1-1~1-3]。更に、ベンゼン及び放射線は共に曝露により染色体異常を誘発することが広く知られている[1-4, 5]。従って、染色体異常は本評価法に沿ってベンゼンと放射線とを比較するにあたって共通の有力な指標となり得ると考え、本研究では染色体異常試験の結果に基づいてベンゼンの放射線等価係数を決定することとした。

染色体異常試験等の *in vitro* 毒性試験を行う場合、培養の簡単さ等の理由から、株化細胞等の不死化細胞を用いるのが一般的である。しかしながら発がんの本質は正常細胞ががん化することにより、ベンゼンのエンドポイントである急性骨髄性白血病の発症においては、標的臓器である骨髄中の正常な造血細胞のがん化が重要な意味を持つと考えられる。従って、*in vitro* 毒性試験にヒト正常骨髄細胞を用いることで実験系が実際の発症機構に近付き、より信頼性の高い結果が期待できる。そこで本研究では、ヒト正常骨髄由来造血細胞 CD34<sup>+</sup>を用いた染色体異常試験を行い、ベンゼンと放射線の用量反応関係を比較する。また、あわせて PBPK モデルを用いたベンゼンの体内動態評価を行って骨髄中濃度を把握し、放射線等価係数と組み合わせることでベンゼンの誘発する白血病リスクを評価する。

上述の通り染色体異常は白血病のリスク評価において有力なマーカーであると考えられるが、白血病をはじめとするがんの発症機構は実に複雑であり、多数の遺伝子群、タンパク質群の作用が関連するとされている。従って、曝露による遺伝子やタンパク質の発現パターンの変化を網羅的に解析することで、リスク評価に応用し得る重要な知見が得られる可能性がある。そこで本研究では、マイクロアレイと二次元電気泳動とを用いて遺伝子及びタンパク質の網羅的な発現変動解析を行い、その結果をリスク評価に適用する可能性についても検討する。

また、放射線等価係数を用いたリスク評価の適用範囲や限界を探るには、ベンゼンのみならず様々な物質を対象とした評価を行い、検証データを蓄積することが重要である。そこで本研究ではベンゼン誘発白血病以外の対象としてアクリロニトリルによる肺がん、そして DDT による肝臓がんを選び、それぞれのリスクを放射線等価係数を用いて評価することで本評価法の適用可能性について検討を加える。

すなわち、本研究の目的は以下の通りである。

1. ベンゼン及び放射線を対象としてヒト正常骨髄細胞を用いた染色体異常試験を行い、その結果を比較することでベンゼンの放射線等価係数を決定する
2. PBPK モデルを用いたベンゼンの体内動態評価を行い、標的臓器である骨髄中の濃度を把握する
3. ベンゼンの放射線等価係数と骨髄中濃度とを用いて、放射線疫学情報を適用することでベンゼン誘発白血病リスクを評価し、ベンゼンの疫学情報と比較することで本評価の妥当性を検証する

4. マイクロアレイと二次元電気泳動とを用いて遺伝子及びタンパク質の網羅的な発現変動解析を行い、その結果をリスク評価に適用する可能性について検討する
5. ベンゼン誘発白血病以外の評価対象としてアクリロニトリルによる肺がん及び DDT による肝臓がんを選び、それぞれのリスクを放射線等価係数を用いて評価し、本評価法の適用可能性と限界について検討する

#### 1-4 本論文の構成

以上のような目的を設定し、本論文を以下のように構成する。なお、図 1-3 には、本論文の概要を示す。

Chapter 1 では、本研究で提案する放射線等価係数を用いたヒト健康リスク評価法の意義を説き、その確立を目指して本研究の目的を設定する。

Chapter 2 では、ヒト正常骨髄細胞を用いた染色体異常試験を行うにあたって必須となる細胞培養条件について検討を行い、最適培養条件を決定する。

Chapter 3 では、Chapter 2 で決定した最適培養条件に従って培養したヒト正常骨髄細胞を用いて染色体異常試験を行い、その結果得られる用量反応関係をベンゼンと放射線とで比較することでベンゼンの放射線等価係数を決定する。

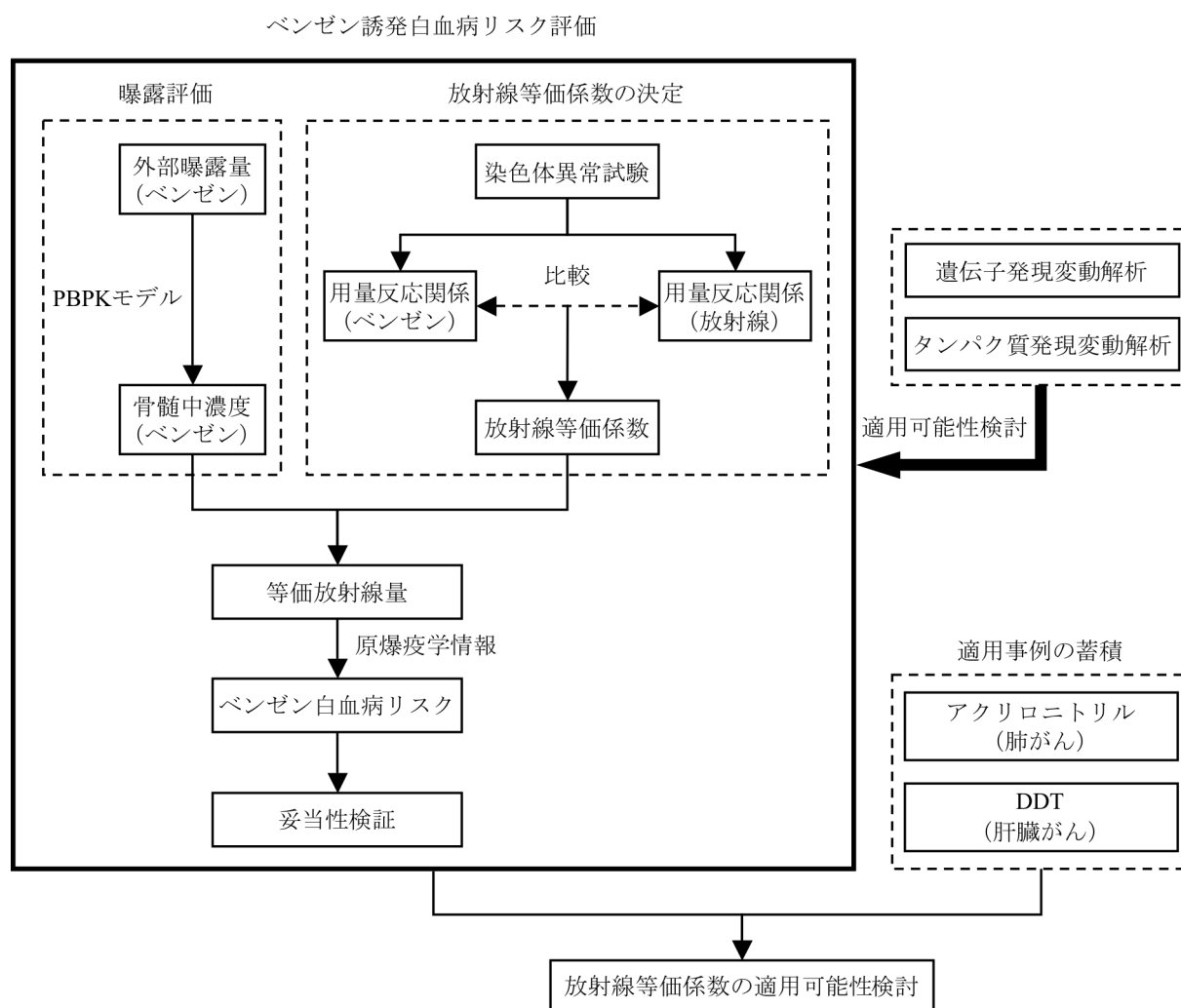


図 1-3 本論文の概要

Chapter 4 では、PBPK モデルを用いたベンゼンの体内動態評価を行い、一定のベンゼン曝露に対応する骨髄中濃度を計算する。また、その結果と Chapter 3 で得た放射線等価係数とを組み合わせることでベンゼン誘発白血病リスクを評価し、ベンゼンの疫学情報との比較により評価値の妥当性を検証する。

Chapter 5 では、ベンゼン代謝物あるいは放射線を曝露した細胞を用いてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現変動解析を行い、ベンゼンと放射線の曝露に共通のマーカー遺伝子を探索すると共に遺伝子発現変動パターンをリスク評価に適用する可能性について検討する。

Chapter 6 では、同様にベンゼン代謝物あるいは放射線を曝露した細胞を用いて二次元電気泳動による網羅的なタンパク質変動解析を行い、ベンゼンと放射線の曝露に共通のマーカータンパク質を探索する。また、得られた結果を Chapter 5 で得た遺伝子発現変動解析の結果と比較することで、マーカータンパク候補群の有用性について検討する。

Chapter 7 では、Chapter 2~Chapter 6 までのベンゼン誘発白血病リスク評価に関する検討を総括し、本研究で提案する放射線等価係数を用いたリスク評価の概要と将来像について整理して述べる。また、アクリロニトリルの誘発する肺がん及び DDT の誘発する肝臓がんの各々を対象として放射線等価係数を用いたリスク評価を試み、それらの結果から放射線等価係数の適用可能性について考察する。

Chapter 8 では、本研究で得られた成果をまとめると共に、今後の展望及び検討すべき課題について述べる。

#### 参考文献

- 1-1. Smith M.T.(2010): *Advances in understanding benzene health effects and susceptibility*, *Annual Review of Public Health*, 31, 133-48.
- 1-2. Pedersen-Bjergaard J., Christiansen D.H., Desta F. and Andersen M.K.(2006): *Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia*, *Leukemia*, 20(11), 1943-9.
- 1-3. Pedersen-Bjergaard J., Andersen M.K., Andersen M.T. and Christiansen D.H.(2008): *Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia*, *Leukemia*, 22(2), 240-8.
- 1-4. Natelson E.A.(2007): *Benzene-induced acute myeloid leukemia: a clinician's perspective*, *American Journal of Hematology*, 82(9), 826-30.
- 1-5. Kodama Y., Pawel D., Nakamura N., Preston D., Honda T., Itoh M., Nakano M., Ohtaki K., Funamoto S. and Awa A.A.(2001): *Stable chromosome aberrations in atomic bomb survivors: results from 25 years of investigation*, *Radiation Research*, 156(4), 337-46.



## Chapter 2 ヒト正常骨髄細胞の最適培養条件の決定

### 2-1 本章の目的

発がんをはじめとする化学物質の毒性は、ヒトの標的臓器において正常な状態にある細胞が悪影響を受けることによって発現する。そのためヒト正常細胞を用いた毒性試験を行うにあたっては、細胞が良好な増殖傾向を示すことが非常に重要である。特に、本研究では染色体異常を主な解析対象とするが、染色体は細胞が細胞周期間期（S 期）を経て有糸分裂（M 期）中期に達することで凝集し、光学顕微鏡下で染色体標本として観察可能な形態を取るため、染色体異常試験を行うためには細胞の正常な増殖が必要不可欠であると言える。従って本章では、染色体異常試験等の各種試験を行うに先立って、ヒト正常骨髄細胞の最適培養条件を決定することを目的とし、様々な培養条件に従ってヒト正常骨髄細胞を培養し、その増殖率を測定した。また、本研究で用いた正常骨髄細胞中には造血幹細胞や造血前駆細胞が豊富に含まれており、培養の進行に従って容易に細胞分化を起こすことが考えられる。そのためヒト骨髄における毒性発現を評価するためには、培養後の細胞においても十分な割合で造血細胞が含まれていることを確認する必要がある。従って本研究では、フローサイトメトリーによる細胞分化解析を行うことで培養後の細胞中の CD34<sup>+</sup>細胞含有率を測定し、造血機能の観点から培養状態を確認した。なお、CD34 は造血前駆細胞に豊富に発現することが知られている表面抗体であり、CD34<sup>+</sup>細胞群には造血細胞が高頻度で存在すると考えられる[2-1]。また、併せて、ベンゼンの血液毒性発現に関わる重要な代謝酵素である MPO の含有量を測定し、代謝機能の観点からも培養状態を確認した。

すなわち、本章の目的は以下の 3 点である。

1. ヒト正常骨髄細胞を様々な培養条件で培養し、その増殖率を測定することで最適培養条件を決定する
2. フローサイトメトリーを用いた細胞分化解析により、培養状態を造血機能の観点から確認する
3. 培養後の細胞における MPO の含有量を測定し、培養状態を代謝機能の観点から確認する

### 2-2 フローサイトメトリー

フローサイトメトリー（flow cytometry）は、流体中に懸濁した微粒子を計数、分類して分析する手法であり、細胞のサイズや構造に関する情報を得て細胞を分類、解析することができる。フローサイトメトリーでは、フローセル中に細胞を 1 個ずつ流してレーザー光を照射し、様々な検出器によりその散乱光や蛍光の強度を測定する。レーザー光と同方向の検出器においては前方散乱光（Forward Scatter, FSC）強度を、垂直方向の検出器においては測方散乱光（Side Scatter, SSC）強度や種々の蛍光強度を検出する。それぞれの検出器で測定した光強度の変動から、個々の粒子の物理的あるいは化学的構造に関する様々な情報が得られる。例えば、FSC は測定粒子の大きさに関連した、SSC は測定粒子の内部構造に関連した情報を提供する[2-2]。

本章においては、細胞試料を CD34 antibody 及び 7-AAD (7-aminogactinomycin D) を用いて蛍光標識することで死細胞を除去して CD34<sup>+</sup>生細胞の割合を測定し、造血機能の確認とした。

### 2-3 MPO

MPO は骨髄中の造血細胞に豊富に発現している分子量約 150kDa[2-3]の代謝酵素である[2-4~2-8]。MPO については、骨髄細胞において酸素ラジカルによる損傷から DNA を保護する役割が報告されている[2-9]他、ベンゼン曝露によって生じたフェノール性代謝物を更に毒性の強いキノン類へ酸化することが知られており[2-10]、ベンゼン等による血液毒性を考えるにあたって非常に重要な役割を担っている[2-11]。

本章においては、培養後の細胞における MPO の含有量を、 $H_2O_2$  によるベンジジンの酸化における酵素反応を用いて測定する[2-12]ことで代謝機能の確認とした。

## 2-4 実験方法

### 2-4-1 試薬及び細胞

使用した細胞は、Bone Marrow Mononuclear Cells (CAMBREX, NJ) 及び Bone Marrow CD34<sup>+</sup> Cells (Lonza, Switzerland) である。また、細胞培養用試薬としては、無血清培地 STEMPRO™-34 及び L-Glutamine は Invitrogen 社 (CA) の、無血清培地 StemSpan® SFEM (Serum-Free Expansion Medium) 及びサイトカインカクテル StemSpan® CC100 は StemCell® Technologies 社 (Canada) の、汎用培地 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) は Lonza 社の、血清 FBS (Fatal Bovine Serum) は MP Biomedicals 社 (OH) の、サイトカイン SCF (Stem-Cell Factor)、GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)、G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor)、IL-3 (Interleukin-3) 及び IL-6 (Interleukin-6) は PEPROTECH 社 (NJ) の製品を、それぞれ購入して用いた。その他の試薬は特に記載の無い限りは和光純薬 (大阪) 製の生化学用または試薬特級を用いた。

### 2-4-2 細胞培養

検討した培養条件は、使用する培地、血清やサイトカイン等の増殖因子及び初期細胞密度を変えた 4 条件であり、その詳細を表 2-1 に示す。表 2-1 に示した条件の内、条件 1 は Delay らの研究[2-13]でヒト骨髓由来 CD34<sup>+</sup> 細胞の培養に用いられた培養条件と同等の条件であり、条件 2 は Bone Marrow Mononuclear Cells に対して CAMBREX 社が推奨する培養条件に基づいている。また、条件 3 は Bone Marrow CD34<sup>+</sup> Cells の無血清培養に関して Lonza 社が推奨する培養条件であり、無血清培地 StemSpan® SFEM はヒト臍帯血由来 CD34<sup>+</sup>細胞を対象とした Lim らの研究[2-14]においても用いられている。条件 4 は Bone Marrow CD34<sup>+</sup> Cells の有血清培養に関して Lonza 社が推奨する培養条件となっており、汎用培地 IMDM 及び FBS は Araki らの研究[2-15]でも骨髓由来 CD34<sup>+</sup>細胞の培養に用いられている。

解凍した細胞をそれぞれの条件に従って 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 湿度 100%の条件下で 6 日間培養し、それぞれの培養条件での細胞数の経日変化を血球計数板により測定し、増殖の程度を比較した。なお、以降の各試験には、本試験によって決定した適当な培養条件に従って 6 日間培養した細胞を回収して用いた。

表 2-1 本研究で用いた培養条件の詳細

培養条件	条件1	条件2	条件3	条件4
使用細胞	Bone Marrow Mononuclear Cells		Bone Marrow CD34 <sup>+</sup> Cells	
使用培地	STEMPRO-34		IMDM	StemSpan® SFEM
初期細胞密度	$5.0 \times 10^5$ cells/mL	$5.0 \times 10^4$ cells/mL	$5.0 \times 10^4$ cells/mL	$1.7 \times 10^4$ cells/mL
L-Glutamine	2mM			
SCF	100ng/mL	25ng/mL		
GM-CSF	25ng/mL	10ng/mL		
IL-3	50ng/mL	10ng/mL		
IL-6	10ng/mL	10ng/mL		
G-CSF	1ng/mL			
FBS			15% (v/v)	
StemSpan® CC100			1% (v/v)	

### 2-4-3 フローサイトメトリーを用いた細胞分化解析

回収した細胞を wash solution (2%量の FBS を添加した PBS (Phosphate Buffered Saline)) で洗浄した。洗浄後の細胞から  $4.0 \times 10^6$  cells を取り、wash solution 400 $\mu$ L 中に懸濁した。この細胞浮遊液を 100 $\mu$ L ずつ 4 本の試験管に等分し、それぞれ試験管 I, II, III, IV とした。

試験管 I にはネガティブコントロールとして 20 $\mu$ L の PE mouse IgG1 isotype control (Becton, Dickinson and Company, NJ) を、試験管 II 及び IV にはそれぞれ 20 $\mu$ L の anti human CD34-PE antibody (Becton, Dickinson and Company) を添加し、4 本の試験管を室温、暗所にて 30 分間静置した。各溶液を wash solution で 2 度洗浄した後、室温、1500rpm にて 5 分間遠心沈降し、上清を除去した。その後、試験管 III 及び IV 中の細胞塊にはそれぞれ 20 $\mu$ L の 7-AAD (Becton, Dickinson and Company) を加えて室温にて 10 分間静置した。4 本の試験管それぞれに 500 $\mu$ L の wash solution を添加し、FACS Calibur™ (Becton, Dickinson and Company) を用いて解析を行った。

ここで、CD34<sup>+</sup>細胞は染色操作時に CD34 antibody を取り込むが、死細胞もまた抗体を取り込んでしまうため、CD34 antibody のみによっては死細胞を分別除去して CD34<sup>+</sup>細胞を検出することはできない。ここで、核染色剤である 7-AAD は、膜の形状が保てなくなった死細胞に浸透しやすい性質を持っている[2-16]。そこで本試験ではこれを利用することで、生存 CD34<sup>+</sup>細胞のみを検出した。本試験で作成した 4 本の試験管の内、CD34 antibody と 7-AAD の両方を添加した試験管 IV を細胞分化解析に用い、PE mouse IgG1 isotype control のみを添加した試験管 I は機器の初期設定及びバックグラウンドの設定に、CD34 antibody のみを添加した試験管 II は CD34 の検出感度補正に、7-AAD のみを添加した試験管 III は 7-AAD の検出感度補正に用いた。

### 2-4-4 MPO 含有量の測定

回収した細胞を細胞密度  $5.0 \times 10^4$  cells/mL にて播種して 24 時間の前培養を行った後、細胞を回収し、PBS を用いて 2 度の洗浄を行った。洗浄後の細胞から  $2.5 \times 10^6$  cells または  $5.0 \times 10^6$  cells を取り、600mM PBS 500 $\mu$ L 及び 30% TritonX (MP Biomedicals) 60 $\mu$ L、滅菌水 5.44mL を混合して事前調製した MPO lysis solution 1mL 中に懸濁した。この細胞浮遊液に、液体窒素凍結、37°C 温浴という凍結融解サイクルを 3 度繰り返すことで細胞を完全に溶解した。細胞浮遊液を 4°C, 12000rpm にて 15 分間遠心沈降し、上清を除去した。残った細胞塊に TMB reacting solution を 90 $\mu$ L 添加し、37°C にて 5 分間インキュベートした。TMB reacting solution は、500mM PBS 100 $\mu$ L 及び N,N-ジメチルホルムアミドを用いて 20mM に調製した TMBZ (同仁化学、熊本) 80 $\mu$ L を滅菌水 820 $\mu$ L に混合して事前調製した。その後 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 10 $\mu$ L 加え、37°C にて 4 分間インキュベートすることで青色への呈色反応を行った。4 分後 100 $\mu$ L の 5M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> を添加して溶液の pH を変化させることで呈色反応を停止させた。5M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> の添加により MPO の検出感度が向上することが知られており[2-17]、溶液の吸収極大波長が 650nm から 450nm へと変化して溶液は鮮やかな黄色を呈する。

TMB 反応終了後の溶液を 37°C, 12000rpm にて 2 分間遠心沈降し、上清の波長 450nm における吸光度 ( $O.D_{450}$ ) を測定した。なお、上述のプロトコールにおいて 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に代えて滅菌水を用いることでブランク試料を作製し、式(2-1)に従って細胞試料の正味吸光度を計算した。また、細胞試料とは別に、購入した MPO enzymes (純度 95%以上; ELASTIN Products, MO) を用いて同様の操作を行うことで検量線を作成し、その検量線に基づいて細胞試料中の MPO 含有量を決定した。

$$\Delta O.D_{450} = (O.D_{450})_{sample} - (O.D_{450})_{blank} \quad (2-1)$$

## 2-5 結果

### 2-5-1 細胞培養

それぞれの培養条件における増殖曲線を図 2-1 に示す。なお、縦軸には増殖率として、各経過日数時点での測定細胞数の、初期細胞数に対する比を取った。

条件 4 では培養 3 日目から増殖傾向が見られ、培養 6 日目で約 15.9 倍と十分な増殖が観察された。しかしながら、他の培養条件については、条件 2 で培養 4 日目に約 1.47 倍の増殖率を示したものの正常な増殖傾向とは考えられず、条件 1 及び条件 3 に至っては全く増殖傾向が見られなかった。従って唯一十分な増殖傾向を示した条件 4 を最適培養条件とし、以降の試験には条件 4 に従って培養した細胞試料のみを用いた。

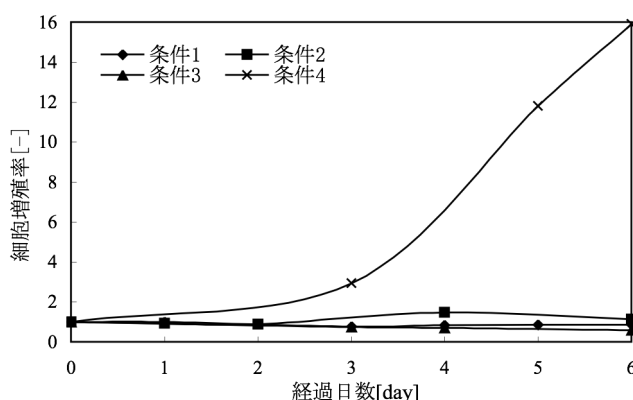


図 2-1 それぞれの培養条件における増殖曲線

### 2-5-2 細胞分化解析

フローサイトメトリーにおいては、デブリや凝集細胞等の解析に不必要な粒子の情報を除去する必要がある、その操作をゲーティングと呼ぶ。本試験では、FSC 強度及び SSC 強度に基づいてゲーティングを行った。ゲーティングの結果を図 2-2 に示す。図 2-2 では、横軸が FSC 強度を、縦軸が SSC 強度を示す。すなわち横軸は粒子の大きさを示し、縦軸は粒子の内部構造の複雑さを表している。専門家の助言のもと、図 2-2 から単一の細胞によると考えられるプロット群を目視により抽出し、多角形で示した領域内の細胞集団を本試験での解析対象として他の粒子の情報は除去した。

ゲーティング後の細胞集団を対象として、CD34 による蛍光強度及び 7-AAD による蛍光強度に基づいて細胞分化解析を行った。解析結果を図 2-3 に示す。図 2-3 では、横軸に CD34 蛍光強度を、縦軸に 7-AAD 蛍光強度を取り、CD34 及び 7-AAD それぞれの検出感度補正結果に基づいて陽性ラインを設定することで対象細胞集団を 4 領域に分類し、各領域に属する細胞数の百分率を図 2-3 中の数値で示した。この 4 領域の内、右上領域は CD34 陽性かつ 7-AAD 陽性、すなわち CD34<sup>+</sup>死細胞を示す領域であり、同様に右下領域は CD34<sup>+</sup>生細胞を、左上領域は CD34<sup>-</sup>死細胞を、左下領域は CD34<sup>-</sup>生細胞を、それぞれ示す。細胞分化解析の結果、条件 4 に基づいて培養した細胞試料中に占める CD34<sup>+</sup>生細胞の割合は 14.2%であった。

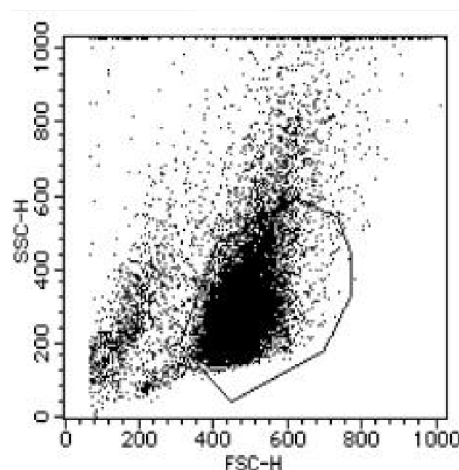


図 2-2 ゲーティング結果

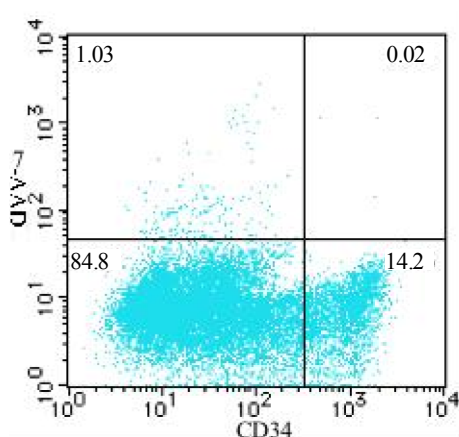


図 2-3 細胞分化解析結果

### 2-5-3 MPO 含有量の測定

MPO 含有量測定試験で作成した検量線を図2-4に、その1次回帰式を式(2-2)に示す。

$$y = 449x - 0.0246 (R^2 = 0.988) \quad (2-2)$$

ただし、

$x$ : 試料懸濁液中のタンパク量[mg/mL]

$y$ : 正味吸光度  $\Delta O.D_{.450}$ [-]

である。

この検量線及び測定した $\Delta O.D_{.450}$ に基づき、また、検量線作成に用いた MPO 酵素の純度を 95%、MPO の分子量を 150kDa として単位細胞数あたりの MPO 含有量を決定した。本試験においては細胞数  $2.5 \times 10^6$  cells にて 2 試料、 $5.0 \times 10^6$  cells にて 3 試料の合計 5 試料分の測定を行った。これら 5 試料を順に 2.5a, 2.5b, 5.0a, 5.0b, 5.0c と呼ぶこととする。5 回の測定それぞれの結果とその平均値及び標準偏差を表 2-2 に示す。計算の結果、条件 4 に従って培養した細胞中の MPO 濃度は  $872 \pm 406$  pmol/ $10^6$  cells となった。

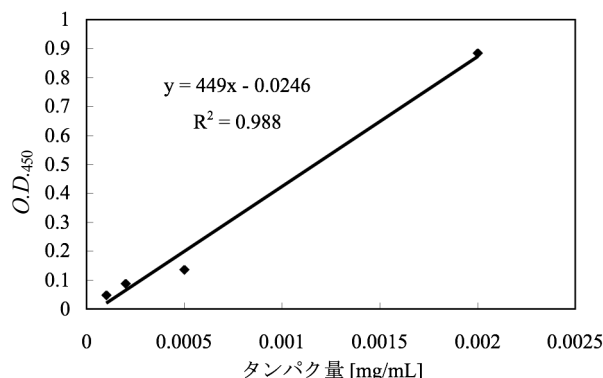


図 2-4 作成した MPO 検量線

表 2-2 MPO 含有量測定結果

サンプル	$\Delta O.D_{.450}$ [-]	細胞中MPO [pmol/ $10^6$ cells]
2.5a	0.405	485
2.5b	1.363	1560
5.0a	1.221	703
5.0b	1.394	800
5.0c	1.416	813
平均値	-	872
標準偏差	-	406

### 2-6 考察

本章では表 2-1 に示した 4 条件のそれぞれに従ってヒト正常骨髓細胞を培養し、その細胞増殖率から最適培養条件を決定した。また、培養後の細胞の分化解析及び MPO 含有量の測定を行い、造血機能及び代謝機能のそれぞれの観点から培養状態を確認した。

培養条件 1 及び条件 3 については細胞の増殖が全く見られなかった。条件 2 に関しては培養 4 日目に約 1.47 倍とわずかな増殖率を示したものの明らかな増殖傾向は観察されず、正常な培養状態にあるとは考えられなかった。すなわち以上の 3 条件に関しては、細胞分裂が正常に進行せずに細胞周期 S 期ではなく静止期 ( $G_0$  期) へと移行して停滞し、染色体を形成する M 期中期に達していないことが考えられる。一方、培養条件 4 では培養 3 日目から増殖傾向が見られ、培養 6 日目で約 15.9 倍と十分な増殖が観察され、対数増殖期を有する理想的な増殖傾向であると言える。そこで条件 4 をヒト正常骨髓細胞に対する最適培養条件とし、細胞分化解析及び MPO 活性の測定による培養状態の確認を行った。

細胞分化解析の結果、条件 4 に従って 6 日間培養した後の細胞中に占める  $CD34^+$  生細胞の割合は 14.2% であった。ここで、ヒト骨髓中に  $CD34^+$  細胞が占める割合は約 1% であるとの報告[2-18]があり、本章における測定値はこの報告値を大きく上回っている。従って、培養後の細胞には骨髓における毒性の標的である造血細胞が通常のヒト骨髓よりも豊富に存在していると考えられ、骨髓における毒性を敏感に評価し得る系となっていると言える。すなわち、造血機能の観点からヒト骨髓における毒性を評価するにあたって適切な培養状態であることが確認されたと言える。

また、MPO 含有量測定試験の結果、条件 4 に従って 6 日間培養した後の細胞中の MPO 含有量は  $872 \pm 406$  pmol/ $10^6$  cells ( $n=5$ ) となった。この結果は、本研究と同一の測定法を用いて測定した、ヒト骨髓性白血病株化

細胞 HL-60 中の MPO 含有量の報告値  $310.3\text{pmol}/10^6\text{cells}$ [2-19]よりも大きな値であった。なお、表 2-2 に示した各試料の  $O.D_{.450}$  値を見るに、試料 2.5a を除いた 4 試料では  $O.D_{.450}$  測定値が図 2-4 に示した検量線の範囲を逸脱しており、本研究での MPO 濃度計算値には検量線の外挿に伴う誤差が含まれると考えられる。しかしその一方で、検量線の範囲内の  $O.D_{.450}$  値を示した試料 2.5a においてもその MPO 濃度は  $485\text{pmol}/10^6\text{cells}$  と、HL-60 中の MPO 濃度の報告値を上回っており、他の 4 試料はより大きい吸光度を示したことから MPO 濃度が更に大きいものと考えられるため、本試験での細胞中の MPO 濃度は同一の測定法に基づいて報告された HL-60 中の MPO 濃度よりも大きいという判断は妥当であると考えた。ここで、MPO は骨髄系の造血細胞に発現している代謝酵素で[2-4-2-8]、特に好中球に豊富に含まれていることが知られており、顆粒球の分化過程の前骨髄球の時期に活発に産生される[2-20,21]。HL-60 細胞は顆粒球への分化過程にある前骨髄球であり、MPO を産生していることが明確に確認されている培養細胞である[2-20,22]。従って、本試験において 6 日間の培養後の細胞においても HL-60 細胞を上回る MPO 含有量が測定されたことは、ヒト骨髄の正常な代謝機能を再現するに足る代謝活性を有していることを裏付けていると考えられ、代謝機能の観点からも適切な培養状態であることが確認されたとと言える。

本章での検討の結果、ヒト正常骨髄細胞に対する最適培養条件として表 2-1 に示した条件 4 を見出した。また、本条件に従って 6 日間培養した後の細胞を用いて細胞分化解析及び MPO 含有量の測定を行い、造血機能及び代謝機能の両者の観点から、ヒト骨髄における毒性を適切に評価可能な培養状態にあることが確認できた。従って、以降の章におけるヒト正常骨髄細胞を用いた試験系には、細胞の培養条件として本条件を用いることとした。

#### 参考文献

- 2-1. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, John Hopkins University School of Medicine(2008): *In OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/142230>, (Accessed Sep. 24th, 2010)
- 2-2. ベックマン・コールター(2010): サイトメトリードットコム, <http://www.bc-cytometry.com/> (Accessed May 23rd, 2010).
- 2-3. Nauseef W.M.(1986): *Myeloperoxidase biosynthesis by a human promyelocytic leukemia cell line: insight into myeloperoxidase deficiency*, *Blood*, 67(4), 865-72.
- 2-4. Taguchi J., Miyazaki Y., Tsutsumi C., Sawayama Y., Ando K., Tsushima H., Fukushima T., Hata T., Yoshida S., Kuriyama K., Honda S., Jinnai I., Mano H. and Tomonaga M.(2006): *Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia*, *Leukemia Research*, 30(9), 1105-12.
- 2-5. Babior B.M.(1978): *Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts)*, *The New England Journal of Medicine*, 298(12), 659-68.
- 2-6. Babior B.M.(1978): *Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts)*, *The New England Journal of Medicine*, 298(13), 721-5.
- 2-7. Koeffler H.P., Ranyard J. and Pertcheck, M.(1985): *Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation*, *Blood*, 65(2), 484-91.
- 2-8. Winterbourn C.C., Vissers M.C. and Kettle A.J.(2000): *Myeloperoxidase*, *Current Opinion in Hematology*, 7(1), 53-8.
- 2-9. Murao S., Stevens F.J., Ito A. and Huberman E.(1988): *Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(4), 1232-6.

- 2-10. Smith M.T.(2010): *Advances in understanding benzene health effects and susceptibility*, *Annual Review of Public Health*, 31, 133-48.
- 2-11. Sadler A., Subrahmanyam W. and Ross D.(1988): *Oxidation of catechol by horseradish peroxidase and human leukocyte peroxidase: reactions of o-benzoquinone and o-benzosemiquinone*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 93(1), 62-71.
- 2-12. Maelhy A.C. and Chance B.(1954): in *Methods of Biochemical Analysis* (Glick D., ed.), Interscience.
- 2-13. Daley J.P., Dadey B.M., Wysocki M.G., Caligiuri M.A. and Biddle W.C.(1996): *Ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells in serum-free STEM-34 medium*, *Focus*, 18(3), 62-7.
- 2-14. Lim C.K., Sun L., Feng Q., Law P., Chua W.T., Lim S.N. and Hwang W.Y.(2008): *Effect of anti-CD52 antibody alemtuzumab on ex-vivo culture of umbilical cord blood stem cells*, *Journal of Hematology & Oncology*, 1(19).
- 2-15. Araki H., Chute J.P., Petro B., Halliday L., Hoffman R. and Mahmud N.(2010): *Bone marrow CD34+ cells expanded on human brain endothelial cells reconstitute lethally irradiated baboons in a variable manner*, *Leukemia & Lymphoma*, 51(6), 1121-7.
- 2-16. 塩谷美夏, 長村登紀子, 須郷美智子, 崔硯, 高橋敦子, 平井雅子, 高橋恒夫(2004): 凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法-ProCOUNT 法と 7-AAD 法による比較検討, *Japaneses Journal of Transfusion Medicine*, 50(4), 605-12.
- 2-17. Schattenberg D.G., Stillman W.S., Gruntmeir J.J., Helm K.M., Irons R.D. and Ross D.(1994): *Peroxidase activity in murine and human hematopoietic progenitor cells: potential relevance to benzene-induced toxicity*, *Molecular Pharmacology*, 46(2), 346-51.
- 2-18. 三浦恭定(1983): *血液幹細胞*, 中外医学社.
- 2-19. Noguchi Y.(2001): *Evaluation of oxidative DNA damage induced by benzene metabolite hydroquinone*, Master's thesis at Kyoto University Graduate School of Engineering.
- 2-20. Yamada M., Mori M. and Sugimura T.(1981): *Purification and characterization of small molecular weight myeloperoxidase from human promyelocytic leukemia HL-60 cells*, *Biochemistry*, 20(4), 766-71.
- 2-21. Bainton D.F., Ulliyot J.L. and Farquhar M.G.(1971): *The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow*, *The Journal of Experimental Medicine*, 134(4), 907-34.
- 2-22. 山田道之, 橋中一也(1991): 骨髓性白血病細胞HL-60の細胞分化と遺伝子発現の調節, 蛋白質 核酸 酵素, 36(1), 41-53.

## Chapter 3 染色体異常試験によるベンゼンの放射線等価係数の決定

### 3-1 本章の目的

放射線等価係数を設定するにあたっては、対象物質と放射線とで用量反応関係を比較し得る適切なバイオマーカーを選択することが必要不可欠である。ここで、ベンゼンリスク評価のエンドポイントは急性骨髄性白血病であるが、白血病と特に密接な関連を持つ現象として染色体異常が挙げられる。現在までに種々の白血病特異的な染色体異常が報告されており、また、ベンゼン、放射線共に、曝露により染色体異常を誘発することが知られている[3-1,2]。従って染色体異常が放射線等価係数を設定する際の有力なバイオマーカーたり得ると考え、染色体異常試験の結果に基づきベンゼンの放射線等価係数を算出することを本章の目的とした。

すなわち本章では、ヒト正常骨髄細胞にベンゼン及び代謝物を曝露、あるいは X 線を照射し、染色体異常試験を行った。その結果得られた用量反応関係を比較し、ベンゼン及び代謝物の放射線等価係数を決定した。

### 3-2 ベンゼン及び放射線と白血病

#### 3-2-1 白血病

白血病は血液のがんとも呼ばれ、造血系の細胞が骨髄中で腫瘍化し、異常な白血球が骨髄や末梢血中で無制限に増殖することにより正常な血液系及びリンパ系の働きを阻害する病気である。白血病は病状の進行速度により、急速に進行する急性白血病とゆっくりと経過する慢性白血病とに分類される。また、異常細胞の種類により、顆粒球などの骨髄系の細胞を起源とする骨髄性白血病と、リンパ球系の細胞から発生するリンパ性白血病とに分類される。急性白血病では分化の比較的初期段階にある細胞が腫瘍化して発症に至るために分化傾向に乏しく、未熟な細胞が早期に異常増殖する。図 3-1 に示す通り、骨髄系細胞の分化は骨髄芽球に端を発するため、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) では骨髄芽球の異常増殖が見られ、また急性リンパ球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) では未熟なリンパ球の異常増殖が顕著である[3-3]。一方、慢性白血病では分化能を保ちつつ比較的ゆるやかな増殖を示すため、成熟した細胞の異常増殖が見られる。従って、慢性骨髄性白血病 (clonic myeloid leukemia, CML) では顆粒球や血小板の著しい増加が見られ、慢性リンパ性白血病 (clonic lymphoblastic leukemia, CLL) では成熟したリンパ球の異常増殖が見られる[3-4]。

2009 年の統計によると、日本での白血病による死亡率は年間人口 10 万人あたり男性で 7.8 人、女性で 4.9 人、平均 6.3 人で、年間死亡数は男性 4765 人、女性 3131 人の合計 7896 人であり、白血病による生涯がん死亡リスクは男性での 0.6%に対して女性では 0.4%とされている。一方白血病罹患率で見ると、2005 年の統計で、年間人口 10 万人あたり男性で 8.3 人、女性で 5.9 人、平均 7.1 人で、年間罹患数は男性 5200 人、女性 3832 人の合計 9032 人である。[3-5]。また、急性白血病と慢性白血病の発症率の比は約 1:4 であり、急性白血病の内、骨髄性白血病とリンパ性白血病の比は成人で約 4:1、小児では逆に約 1:4 である[3-6]。

白血病の発症機構に関しては未だその全貌に確定的な結論は出ていないが、1960 年の CML における Ph<sup>1</sup>(フィラデルフィア) 染色体の発見[3-7]以来、染色体異常が白血病発症と密接に関連していることが明らかにされており、これまでに Ph<sup>1</sup>染色体以外にも様々な病型特異的な染色体異常が確認されている。また、あわせて近年のオミクス解析技術の飛躍的な発展により、個々の遺伝子変異やタンパク発現を対象とした研究が数多く蓄積されており、様々な遺伝子あるいはタンパク質と白血病発症との関連が示唆されている。これらの、染色体異常、遺伝子変異、そしてタンパク質と白血病との関連に関する現時点での知見に関しては、本論文の 3-3, 5-2, 6-2 でそれぞれ詳しく述べる。



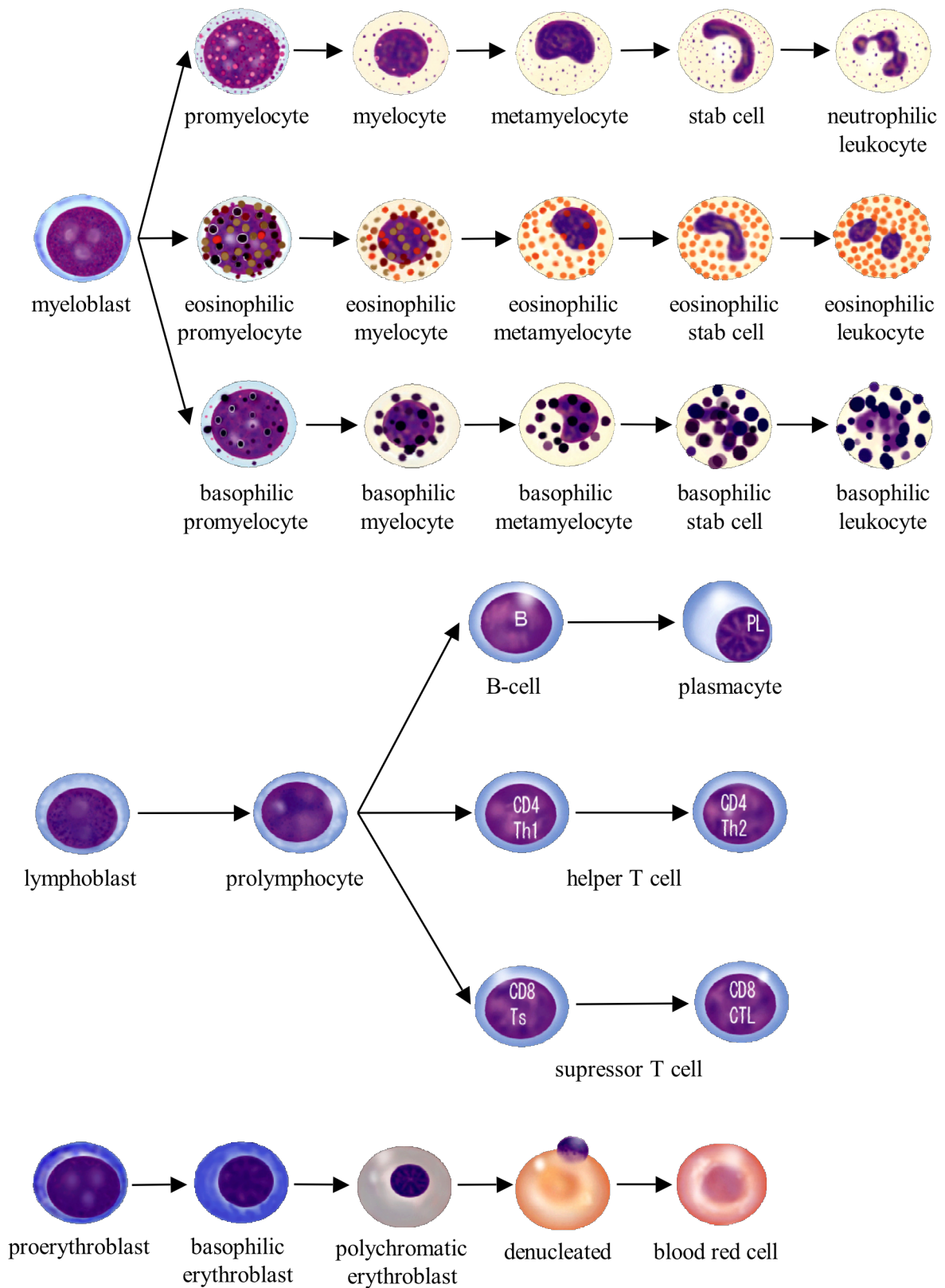


図 3-1 血液細胞の主な分化過程（出典：[3-8]）

### 3-2-2 ベンゼン及びその代謝物

#### 3-2-2-1 ベンゼン

ベンゼン（分子式  $C_6H_6$ ）は最も単純な六員環構造を有する芳香族化合物で、常温下で特徴的な臭気のある無色透明の液体である。揮発性が高く、また、可燃性であり、沸点は  $80.1^{\circ}C$ 、引火点は  $-11^{\circ}C$  である[3-9]。

ベンゼンは実験動物とヒトの両者に染色体異常を誘発することが知られており、また、疫学調査から職業曝露と白血病発症との因果関係が明らかにされ、ヒトへの発がん性が立証されている。スチレンモノマー等の合成材料や各種溶剤として広く使用されており、環境経由のヒトへの曝露経路は呼吸による吸入曝露がその大半を占め、食物及び飲料水からの経口摂取量は吸入摂取量の 500 分の 1 程度である[3-9]。また、消費者製品経由のヒトへの曝露経路としては、タバコの煙、燃料油、各種溶剤からの揮発による曝露が考えられる。ベンゼンについては様々な国内及び国際機関によってその発がん性が評価・分類されている。その分類区分を表 3-1 に示す[3-10]。また、ACGIH（American Conference of Governmental Industrial Hygienists）は、作業環境における許容濃度 TLV（threshold limit value）を  $1.6mg/m^3$ -TWA（time-weighted average, 時間加重平均）と設定しており、一方、日本産業衛生学会が設定した作業環境許容濃度は  $0.3mg/m^3$  である[3-10]。日本での法規制としては、大気汚染防止法により、有害物質の中でも特に優先的に対策に取り組むべき物質として「優先取組物質」に指定されており[3-11]、その環境基準は  $3\mu g/m^3$  である[3-12]。

ベンゼンは体内に摂取されると、CYP（cytochrome P450）や MPO（myeloperoxidase）等の生体内の代謝酵素によってフェノールからカテコールやヒドロキノンを経てベンゾキノン等のキノン体へと代謝される[3-13]。ベンゼンはそれ自体では安定な物質であるが、こうした代謝によって生成される代謝生成物の一部が細胞毒性、変異原性を持つとされ、ベンゼン誘発白血病的発症に寄与すると考えられている[3-14]。従って細胞レベルの毒性試験の結果に基づいてベンゼンによる健康リスクを評価するにあたっては、ベンゼン代謝物を曝露した細胞を用いた毒性試験を行うことが必要となる。様々な代謝生成物の中でも、カテコールとヒドロキロンは特に白血病発症への寄与が大きいと考えられており、しばしば研究対象として用いられる。なお、毒性代謝物の主な排泄経路としては、硫酸抱合体あるいはグルクロン酸抱合体の形成による尿中排泄が挙げられる。図 3-2 にベンゼンの主な代謝経路及び関与する代謝酵素を示す[3-15~3-19]。

表 3-1 各機関によるベンゼンの発がん性分類[3-9]

機関	分類区分	分類基準
IARC <sup>1</sup>	1	Carcinogenic to humans
U.S.EPA <sup>2</sup>	A	Carcinogenic to humans
ACGIH <sup>3</sup>	A1	Confirmed human carcinogen
NTP <sup>4</sup>	a	Known to be a human carcinogen
EU <sup>5</sup>	1	Known to be carcinogenic to humans
日本産業衛生学会	1	人間に対して発がん性のある物質

<sup>1</sup>IARC: International Agency for Research on Cancer

<sup>2</sup>U.S.EPA: United States Environmental Protection Agency

<sup>3</sup>ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists

<sup>4</sup>NTP: National Toxicology Program

<sup>5</sup>EU: European Union

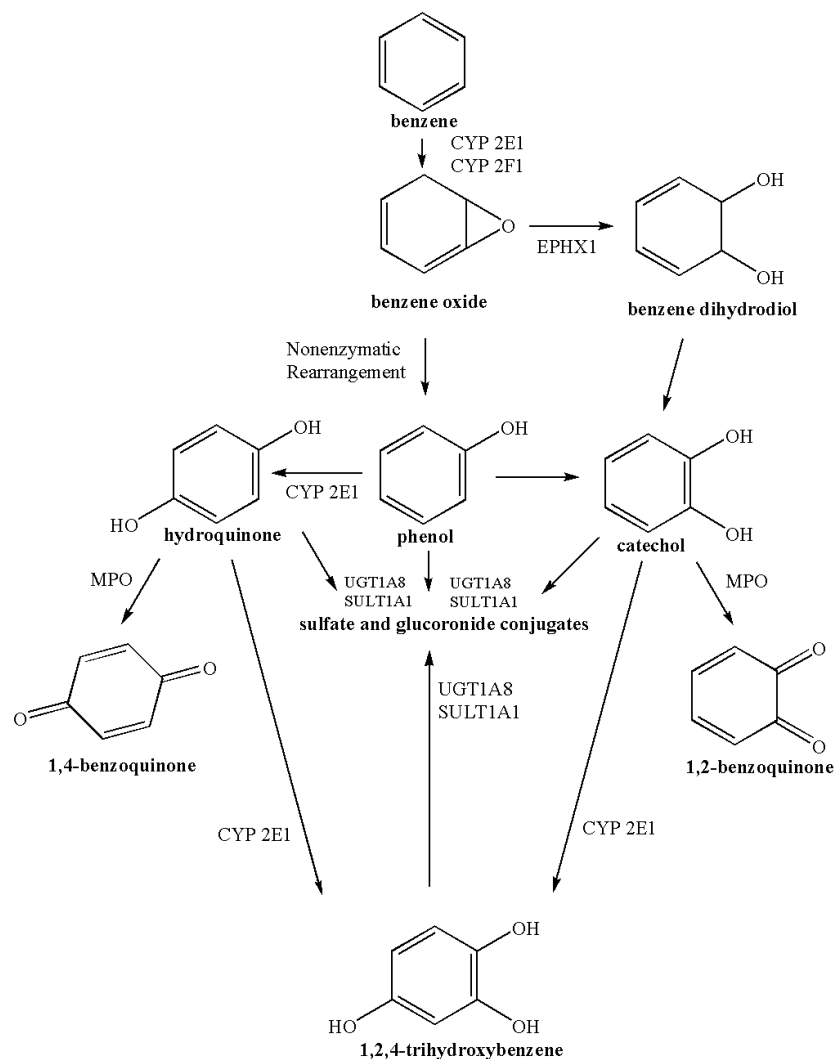


図 3-2 ベンゼンの主な代謝経路及び関与する代謝酵素

### 3-2-2-2 カテコール

カテコール (catechol, CAT) はベンゼン環上の *ortho* 位に 2 個の水酸基を有する分子式  $C_6H_6O_2$  の芳香族化合物で、ピロカテコールとも呼ばれる。常温下で特徴的な臭気のある無色の固体であり、空気や光への曝露で褐色に変色する。香料や医薬品、重合防止剤の原料や、酸化抑制剤、ゴム加硫剤、染毛量など用途は多岐に渡り、2007 年の PRTR データによると、わが国では 1 年間に約 1.4 トンが環境中へ排出されたと見積もられている。また、CAT は植物中やタバコの煙にも含まれており、植物の摂取やタバコの煙の吸入による曝露が想定される[3-20]。更に、3-2-2-1 で述べた通り、CAT は生体内でのベンゼンの代謝過程でフェノールが酸化されることでも生成される[3-13]。

CAT の発がん性については、実験動物における変異原性、遺伝毒性試験では *in vitro*, *in vivo* 共に報告されたほとんどの実験で陽性の結果となり、発がん性試験ではラットで前胃及び腺胃に腫瘍の発生が報告されている[3-21,22]。こうした突然変異の誘発には CAT が代謝を受けて酸化される際に発生する活性酸素種が寄与していると考えられている[3-23]。

以上のように実験動物に対しては発がん性を示唆する報告が多数蓄積されている CAT であるが、その一方でヒトに対する発がん性を示す疫学データは報告されておらず、IARC では CAT を 'possibly carcinogenic to humans' としてグループ 2B に分類している他、ACGIH では 'confirmed animal carcinogen with unknown relevance to humans' として A3 に分類しており、許容濃度 TLV を 5ppm-TWA としている[3-21]。

### 3-2-2-3 ヒドロキノン

ヒドロキノン (hydroquinone, HQ) はベンゼン環上の *para* 位に 2 個の水酸基を有する分子式  $C_6H_4O_2$  の芳香族化合物で、ハイドロキノンとも呼ばれ、常温下で白色の固体である。HQ は従来は白黒写真の現像薬として用いられてきたが、今日では用途が広がり、染料や顔料の原料、重合抑制剤、ゴムの酸化防止剤などにも使われている他、需要量としてはわずかながらシロアリ防除剤や医薬品、化粧品などにも用いられている。2007 年の PRTR データによると、わが国では 1 年間に約 45 トンが環境中へ排出されたと見積もられている。また、HQ は天然にも生成され、コーヒー、赤ワイン、小麦、ブロッコリー等に含まれており、ヒトへの経口曝露源となり得る[3-24]。加えて、CAT と同様、HQ も生体内でのベンゼンの代謝過程でフェノールが酸化されることで生成される[3-13]。

HQ の発がん性については、実験動物における変異原性、遺伝毒性試験では、*in vitro* では CHO (Chinese hamster ovary, チャイニーズハムスター卵巣) 細胞を用いた染色体異常試験や姉妹染色分体交換試験、マウスリンフォーマ試験等で、*in vivo* ではマウスによる小核試験や染色体異常試験で陽性の結果が報告されている。また、発がん性試験では、マウスに対する経口投与で肝細胞腺腫、肝細胞がん、腎細胞腺腫の発生率の、ラットに対する経口投与で肝細胞腺腫、単核球性白血病、腎細胞腺腫の発生率の有意な増加が報告されている[3-25]。やはり CAT の場合と同様に、こうした突然変異の誘発には HQ が代謝を受けて酸化される際に発生する活性酸素種が寄与すると考えられている[3-26,27]。一方ヒトに対する発がん性としては、フィルム関連会社でいくつかの疫学調査が報告されているものの、いずれにおいても腫瘍発生率の有意な上昇は認められていない。ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験では、FISH 法によるヒトリンパ球の染色体異常試験で、5 番染色体と 7 番染色体の数的異常及び欠失[3-28,29]、5,7,8,21 番染色体の欠失[3-30]、そして 1 番染色体の数的異常及び切断[3-31]の誘発が報告されている他、造血細胞 CD34<sup>+</sup>に対しては 5 番染色体と 7 番染色体の数的異常[3-32]を誘発することが報告されている。

IARC では HQ を 'not classifiable as to its carcinogenic' としてグループ 3 に分類している他、ACGIH では 'confirmed animal carcinogen with unknown relevance to humans' として A3 に分類しており、許容濃度 TLV を  $2mg/m^3$ -TWA としている[3-25]。

### 3-2-2-4 カテコールとヒドロキノンの複合曝露

3-2-2-1 で述べたように、体内にベンゼンが摂取されると、生体内での代謝により様々な代謝物が生成され、それらの代謝生成物の一部がベンゼン誘発白血病の発症に寄与すると考えられている[3-13,14]。

これと関連して、Robertson らは、小核試験においてヒト末梢血リンパ球に CAT 75 $\mu$ M と HQ 75 $\mu$ M を複合曝露させた場合に、バックグラウンド値と比較して 16 倍もの小核形成が見られたと報告している[3-33]。また、ヒト前骨髄球性白血病細胞 HL60 に誘発される DNA 付加体量は、CAT と HQ の複合曝露においてそれぞれの単独曝露の場合と比較して 2.2-2.7 倍に増加したとの報告例がある[3-34]。更に、CAT と HQ の複合曝露では、ヒトリンパ芽球株において 7 番染色体及び 8 番染色体のモノソミーを相乗的に誘発し、HQ 単独曝露では見ら

れなかった 5 番染色体の長腕部の欠失を選択的に誘発したと報告されている[3-35]。このように多くの研究報告から、ベンゼンによる白血病発症には種々の代謝物の複合効果が大きく影響する可能性が示唆される。

また、Rickert らは大気中濃度 500ppm のベンゼンに曝露したラットの骨髓中 CAT 及び HQ 濃度を測定し、ピーク濃度として CAT 13.0 ppm, HQ 70.4 ppm との測定値を得た[3-36]。ラットと同様ヒトにおいてもベンゼン曝露後の骨髓中には CAT と HQ が同時に存在すると考えられ、ベンゼン誘発白血病リスクの評価にあたっては、CAT と HQ 等のベンゼン代謝物の複合曝露による影響を定量評価することが必要であると言える。

### 3-2-3 放射線

#### 3-2-3-1 電離放射線と X 線

電離放射線とは、直接あるいは間接的に原子または分子を電離する能力、すなわち電離作用を有する放射線を指し、個々の電離放射線のエネルギーに依存して電離が発生する。一般には電離放射線を単に放射線と称することが多く、電離放射線は粒子線及び電磁波から成る。粒子線の例としては  $\alpha$  線や  $\beta$  線、中性子線等が挙げられ、一方 X 線や  $\gamma$  線は電磁波の代表例である。

X 線は 1pm-10nm 程度の波長を持つ電磁波のことであり、発見者であるレントゲンの名前を取ってレントゲン線と呼ばれることもある。X 線はその高い透過作用から、X 線写真や CT (Computed Tomography, コンピュータ断層撮影) スキャン等、医療分野での利用が主であり、人為起源の被曝としては医療 X 線によるものが最も高い割合を占めている。X 線の発生原理としては X 線管に対して所定の電流を流すことによるものが一般的である。他の放射線源と比べると扱いが容易であるため、X 線は生物学的な研究にしばしば用いられる。

#### 3-2-3-2 電離放射線の健康影響

1927 年に X 線の照射により遺伝子変異が誘発されることが示されて以来、電離放射線の健康影響については盛んに研究が進められてきた[3-37]。

まず、放射線被曝を考えるにあたって、放射線はその発生由来により自然放射線と人工放射線とに分類される。自然放射線としては宇宙線や地球の大地を構成する放射性同位元素に由来する放射線、動植物中の放射性同位元素由来の放射線等が挙げられ、ヒトに対する被曝源の約 8 割を占める[3-38]が、基本的に自然放射線による被曝は不可避であり、放射線防護上問題とすることは少ない。一方、人工放射線による被曝としては、医療 X 線や研究用途での放射性同位元素の利用、放射性廃棄物や核実験によるフォールアウトに由来する被曝、職業曝露等が挙げられ、現状一般的には医療 X 線による被曝が最も高い割合を占めている。

こういった様々な由来の被曝が考えられるが、物質が放射線に照射された時、その線量は吸収線量や線量当量を用いて表現される。吸収線量とは、放射線が単位質量の物質に与えるエネルギーとして定義される。吸収線量の単位は J/kg であるが、これに対して特に Gy (グレイ) という単位が用いられている。ただし、放射線被曝による生体影響は、吸収線量が同じでも放射線の種類によって異なるため、放射線防護を目的とした共通の尺度としては線量当量を用いる。線量当量は吸収線量に対して放射線の種類毎に定められる放射線荷重係数及び線量率による影響を表現する係数を乗じることで計算され、その単位は Sv (シーベルト) である。

広島、長崎の原爆被爆者に対する大規模な追跡調査を中心とした数多くの研究成果の蓄積により、放射線は様々な健康影響を引き起こすことが明らかにされている。その代表例が白血病をはじめとするがんの発生率の増加であり、Bertell は 1Gy の放射線照射が発がん率を 0.05-0.16%増加させると報告している[3-39]他、BEIR (Committee on the biological effects of ionizing radiation) では 0.1Gy の低 LET (linear energy transfer, 線エネルギー付与) 放射線が発がん率を 0.5-1.4%増加させると見積もっている[3-40]。また、ICRP (International Commission

on Radiological Protection) は公衆被曝における線量限度を実効線量で 1mSv/year と設定している[3-41]。なお、実効線量とは、組織毎の線量当量をそれぞれの組織の感受性の差異に基づいて加重平均したものである。この線量限度に対応する死亡リスクは  $10^{-5}$  と見積もられている[3-41]。放射線のリスク評価体系は化学物質と比べて実に膨大な疫学情報に基づいて構築されており、従って放射線のリスク評価値は、現時点でヒト健康影響に対する最も信頼性の高い指針であると言える。

### 3-3 白血病と染色体異常

染色体は遺伝情報を担う DNA と塩基性タンパクであるヒストンを主成分とした糸状の生体物質である。通常ヒトで 23 対 46 本存在し、有糸分裂中期に凝集して光学顕微鏡下で観察出来る。

染色体は DNA 損傷を初期原因として様々な異常を生成し得る。染色体異常は、モノソミーやトリソミー等の染色体本数の数的異常と、相互転座等の部分的な構造に異常をきたす構造異常とに分類され、先天性の異常では数的異常がその 2/3 から 3/4 を占める一方で、後天性の異常では数的異常のみならず種々の構造異常が生成される[3-42]。図 3-3 に化学物質による染色体異常の生成機構の一例の模式図を示す[3-43]。まず化学物質の曝露により DNA が損傷し、その損傷塩基が除去修復される過程で一本鎖切断へと転換され、その後 DNA 合成期に複製エラーが生じることで染色体異常が生成されると考えられている。また、損傷を受けた細胞の一部は分裂を一時停止させて G<sub>0</sub> 期に入り、損傷部位の修復を行う。

白血病の発症と染色体異常とは密接に関連するとされている。例えば、Ph<sup>1</sup> 染色体 (フィラデルフィア染色体) は 9 番染色体の長腕部と 22 番染色体の長腕部との間の相互転座により発生する染色体異常で、95%以上の CML 患者に認められる[3-5]。AML においても様々な病型特異的な染色体異常が確認されており、5 番染色体、7 番染色体のモノソミーあるいは欠失、8 番染色体のトリソミー、11 番染色体短腕部に関わる相互転座、8 番染色体と 21 番染色体の相互転座、15 番染色体と 17 番染色体の相互転座等がその代表例である[3-1,44,45]。特に、相互転座をはじめとする構造異常は放射線照射によっても高頻度に誘発されることが知られており[3-2]、ベンゼン及び放射線誘発白血病に共通するバイオマーカーとして有用であると考えられる。

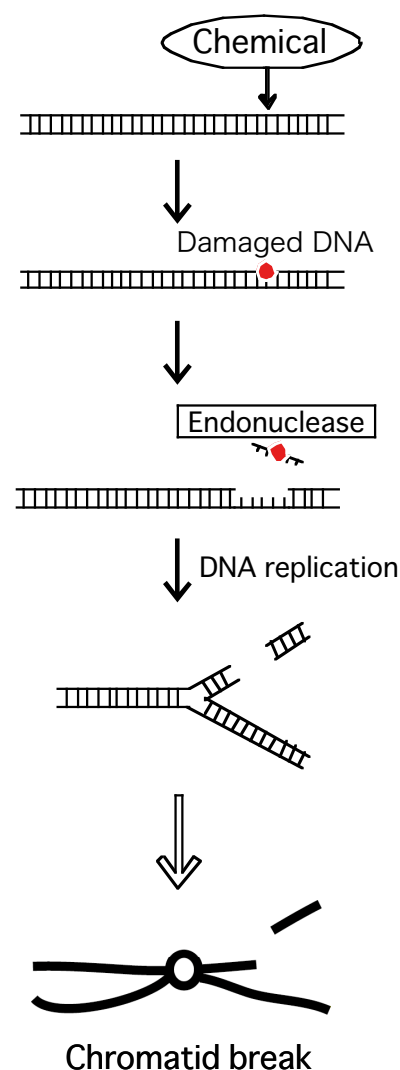


図 3-3 染色体異常生成機構の一例

### 3-4 実験方法

#### 3-4-1 試薬及び細胞

試薬は特に記載の無い限りは和光純薬 (大阪) 製の生化学用または試薬特級を用いた。

使用した細胞は Lonza (Switzerland) より購入した Bone Marrow CD34<sup>+</sup> cells であり、そのドナーは 18 歳 African American 男性である。解凍した細胞を Chapter 2 で決定した最適培養条件に従って 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 湿度 100% の条件下で 6 日間培養し、細胞が対数増殖期にあることを確認した。

### 3-4-2 曝露処理

曝露に先立ち、6日間培養後の細胞を回収し、培養液の半量を新しい培養液と交換して細胞密度  $5.0 \times 10^4$  cells/mL にて播種し直して24時間の前培養を行った。

ベンゼン及びベンゼン代謝物の曝露処理としては、前培養後の培養液に、最終濃度が所定の濃度となるように調製したベンゼンの dimethylsulfoxide (DMSO) 溶液及び CAT (東京化成、東京)、HQ

の水溶液を培養液の1%量 (v/v) 加えて32時間の曝露を行った。曝露に用いた最終濃度を表3-2に示す。なお、CATとHQの複合曝露 (CAT+HQ) では、ベンゼンの職業曝露 (1-25ppm, n=20) によるCATとHQの尿中濃度の測定値が、75パーセンタイル値でそれぞれ 14.6ng/g creatinine と 31.9ng/g creatinine、中央値で 7.2ng/g creatinine と 16.4 ng/g creatinine、25パーセンタイル値で 5.2ng/g creatinine と 9.8ng/g creatinine であったという報告[3-46]に基づき、CATとHQの濃度比を1:2とした。例えばCAT+HQ 1μM は、CAT 0.33μM とHQ 0.67μM の複合曝露を意味する。

また、放射線照射処理としては、前培養後の培養液に、X線照射装置 Radioflex 350 (Rigaku, 東京) (5Gy/min, 250kV, 15mA, Al 2mm filter) を用いて 0Gy, 0.5Gy, 1.0Gy, 1.5Gy の4条件の線量にて照射を行った。照射後の細胞は同じ培養液中で32時間の回復培養を行い、ベンゼン及び代謝物と同様32時間の処理時間とした。

表 3-2 ベンゼン及び代謝物の曝露濃度

曝露物質	最終濃度[μM]
CAT	0, 1, 3, 6
HQ	0, 1, 3, 6
CAT+HQ	0, 1, 3, 6
ベンゼン	0, 5, 20, 100

### 3-4-3 染色体標本の作製

それぞれの処理終了の2時間前に、滅菌水で1% (v/v) に希釈した Metaphase Arresting Solution (MAS; Genial Genetic Solutions, UK) を培養液の2%量 (v/v) 添加した。処理終了後ただちに血球計数板を用いて細胞数を測定した後、0.075M 塩化カリウム溶液中で37℃にて20分間の低張処理を行った。続いて固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1, v/v) を塩化カリウム溶液と同量加えて穏やかに混合し、細胞を半固定した。この細胞半固定液を遠心沈降し、上清を新しい固定液と交換して穏やかに混合する操作を3度繰り返し、再び遠心沈降して上清を除去、最終的に1mL程度の固定液中に懸濁することで細胞を完全に固定した。この細胞固定液を50% (v/v) エタノールで洗浄したスライドグラス上に滴下し、パラフィン伸展器 PSP-400 (井内盛栄堂、大阪) 上で40℃、湿潤条件にて乾燥させた。作成したスライドグラスは1M PBS (pH6.8) で4% (v/v) に希釈したギムザ染色液 (Merck, Germany) 中に30分間浸すことで染色し、染色体標本とした。

### 3-4-4 染色体標本の観察

- 各処理濃度、線量あたり50個の分裂中期像について観察を行い、分裂中期像の選択は以下の基準に従った。
- ・極力整った円状に展開されたものを選び、染色体数が極端に少ない等、染色体が標本作製過程に破損したと考えられるものは観察対象から除外する。
  - ・染色体が過度に凝縮、または伸展しているものは観察対象から除外する。
  - ・染色体の重なりが多いものや、ごみや傷が多い、あるいは形態が不鮮明等の理由で異常の有無が判定できない部分があるものは観察対象から除外する

以上のような特別な理由の無い限り、異常の有無で取捨選択せずに分裂中期像を観察対象とし、接眼10倍、対物100倍の倍率にて観察を行った。

3-3で述べた通り、染色体異常には数的異常と構造異常とがあるが、ギムザ染色法においてはそれぞれの染色体番号を識別して検出することが非常に困難であり、モノソミーあるいはトリソミーを事実上判定できない

ため、数的異常は検出対象から除外し、構造異常を Gap（非染色部位）、Break（染色体切断）、Exchange（染色体交換）の3種類に分類して検出した。なお、Exchange の内、ギムザ染色法では識別できない Translocation（相互転座）や Inversion（逆位）等の染色体異常は解析対象から除外した。また、Gap と Break を区別する基準については、非染色部位が染色分体の幅よりも狭いものを Gap、それ以上のものや断片が残存する腕部と平行でないもの等を Break とした。

### 3-5 結果

#### 3-5-1 細胞毒性試験

曝露処理後に計数した細胞数から、非処理群の細胞数に対する処理群の細胞数の比として生存率を計算した。ベンゼン代謝物、ベンゼン、X 線処理細胞の生存率をそれぞれ図 3-4~3-6 に示す。なお、ベンゼン代謝物処理試験は3度、X 線処理試験は5度繰り返したため、図 3-4、図 3-6 には算出値の標準偏差をエラーバーとして付した。

各処理群の細胞数は、CAT 6 $\mu$ M で 82.2%、HQ 6 $\mu$ M で 75.2%、CAT+HQ 6 $\mu$ M で 56.6%、ベンゼン 100 $\mu$ M で 91.5%、X 線 1.5Gy で 52.2%に、それぞれ低下した。CAT+HQ 複合曝露群と X 線処理群とでは濃度、線量依存的な生存率の低下が顕著に見られた一方で、ベンゼン曝露群においては目立った生存率の低下は観察されなかった。

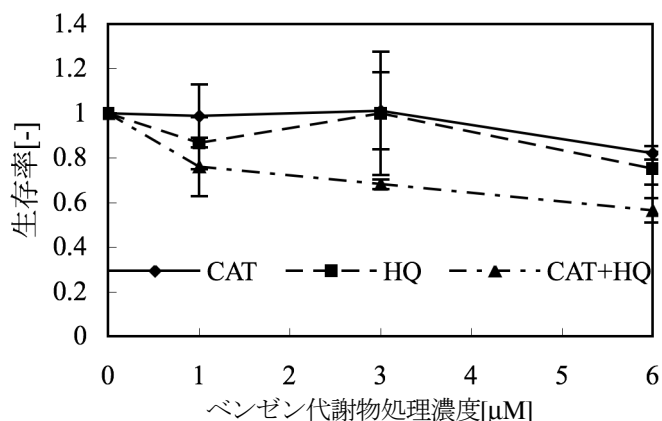


図 3-4 細胞毒性試験結果-ベンゼン代謝物-

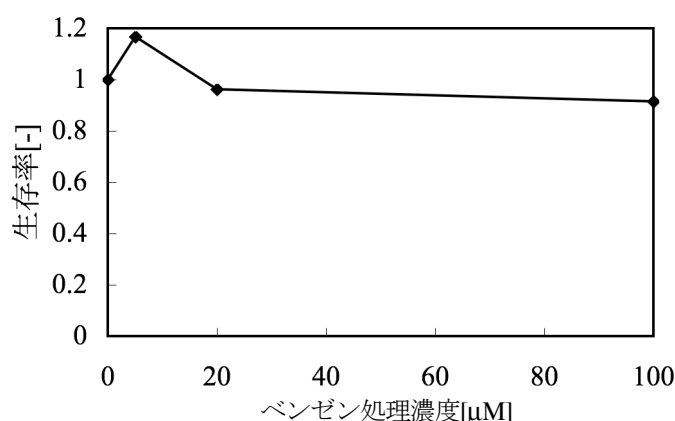


図 3-5 細胞毒性試験結果-ベンゼン-

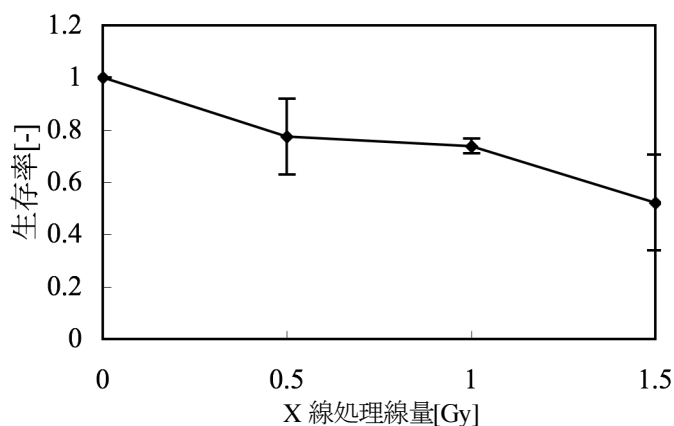


図 3-6 細胞毒性試験結果-X 線-



### 3-5-2 染色体異常試験

染色体異常試験の結果を表 3-3 に示す。なお、表中の MI は、スライドあたり 4000 個程度の細胞の中で分裂染色体が確認できる中期分裂細胞数を計数して細胞 100 個あたりの中期分裂細胞数を算出した、分裂指数 (Mitotic Index) を意味する。また、Gap は解析者の主観及び染色状態に大きく左右されるため、Gap を除いた Break と Exchange の合計を総染色体異常数とし、染色体異常発生頻度として 1 細胞あたりの異常数を X 線とベンゼン及び代謝物との比較に用いた。横軸に処理線量あるいは濃度を、縦軸に染色体異常発生頻度を取った、ベンゼン代謝物、ベンゼン、X 線それぞれについての用量反応関係を図 3-6~3-8 に示す。

染色体異常試験の結果、CAT の 6 $\mu$ M 曝露で 3 $\mu$ M 曝露と比べて Break の発生数が減少したものの、ベンゼン及び代謝物、X 線全ての処理において、処理濃度あるいは線量の増加に伴った染色体異常発生頻度の増加が観察された。染色体異常発生頻度は、非曝露サンプルと比べて、CAT 6 $\mu$ M の処理で 5.5 倍に、HQ 6 $\mu$ M の処理で 19 倍に、CAT+HQ 6 $\mu$ M の処理で 10.5 倍に、ベンゼン 100 $\mu$ M の処理で 4.0 倍に、そして X 線 1.5Gy の処理で 7.3 倍に、それぞれ増加した。

表 3-3 CD34<sup>+</sup>に誘発された染色体異常<sup>a</sup>

Clastogen	Dose	生存率	MI	染色体異常			総異常数 <sup>b</sup>	1細胞あたりの異常数 <sup>b</sup>
				Gap	Break	Exchange		
X線	0 Gy	1.00	2.28	1	3	0	3	0.06
	0.5	0.78	2.76	2	4	2	6	0.12
	1	0.74	2.19	5	12	1	13	0.26
	1.5	0.52	3.19	7	20	2	22	0.44
CAT	0 $\mu$ M	1.00	1.93	1	1	1	2	0.04
	1	0.99	1.15	2	2	1	3	0.06
	3	1.01	2.46	0	10	1	11	0.22
	6	0.82	2.28	1	4	7	11	0.22
HQ	0 $\mu$ M	1.00	2.28	1	1	0	1	0.02
	1	0.87	2.62	2	5	0	5	0.1
	3	1.00	3.14	7	9	0	9	0.18
	6	0.75	3.45	3	18	1	19	0.38
CAT+HQ <sup>c</sup>	0 $\mu$ M	1.00	2.47	0	1	1	2	0.04
	1	0.76	2.18	0	7	0	7	0.14
	3	0.68	1.57	5	5	2	7	0.14
	6	0.57	2.08	2	20	1	21	0.42
ベンゼン	0 $\mu$ M	1.00	3.91	1	2	1	3	0.06
	5	1.17	4.84	3	6	2	8	0.16
	20	0.96	4.14	2	9	2	11	0.22
	100	0.92	3.98	6	8	4	12	0.24

<sup>a</sup>染色体異常の検出は50個の分裂中期像について行った

<sup>b</sup>複合曝露では、CATとHQの濃度の比を1:2とした

<sup>c</sup>ここではGapを除いた染色体異常数の合計を総異常数とした

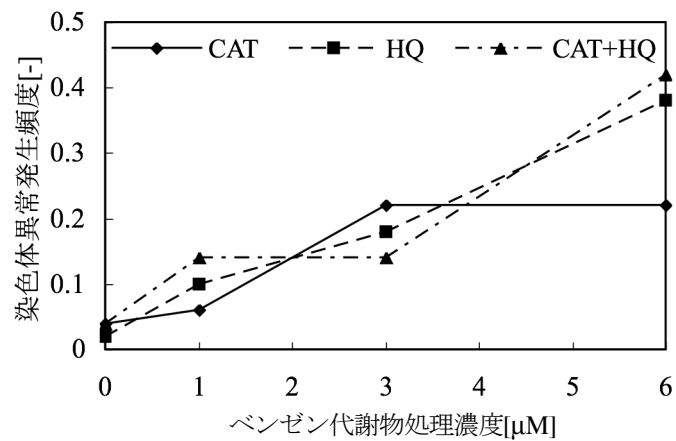


図 3-7 用量反応関係-ベンゼン代謝物-

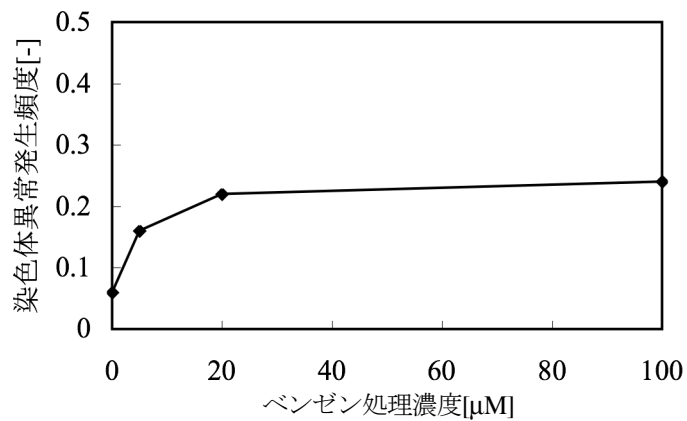


図 3-8 用量反応関係-ベンゼン-

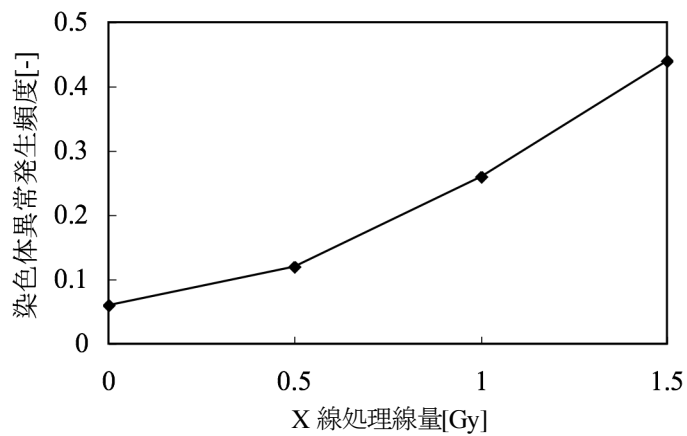


図 3-9 用量反応関係-X線-

### 3-6 ベンゼン代謝物の放射線等価係数の決定

3-5-2 で得た用量反応関係を、LQ モデル及び Weibull モデルを用いて回帰した。

ここで、LQ モデルは、DNA の二本鎖切断が有効致死損傷であり、一本鎖切断では有効な致死損傷にはなり得ないという考え方に基づいたモデルであり、曝露  $D$  に対応する二本鎖切断の発生率  $P$  は、係数  $\alpha, \beta$  を用いて式(3-1)で示される。

$$P = 1 - \exp\{-(\alpha D + \beta D^2)\} \quad (3-1)$$

また、Weibull モデルはワンヒットモデルの一般形であり、同じく係数  $\alpha, \beta$  を用いて式(3-2)で表される。このモデルは  $\beta = 1$  のとき直線、 $\beta > 1$  の時下に凸、 $\beta < 1$  の時上に凸の用量反応曲線を与える。そのため広範なデータに適合可能であるが、病理学的解釈が明確ではないという短所がある。

$$P = 1 - \exp(\alpha D^\beta) \quad (3-2)$$

それぞれの用量反応関係の LQ モデル、Weibull モデルによる回帰式を以下の式(3-3)~(3-10)に示す。なお、ベンゼンに関しては、用量反応関係の傾向がベンゼン代謝物や X 線と著しく異なっており、曝露濃度域等の実験条件が X 線との比較に用いるには適切でなかった可能性もあり、単純な比較を行うことが困難であったため、解析対象から除外した。

#### LQ モデル

$$\text{CAT} : y = 1 - \exp\{-(1.07 \times 10^{-1} C_{\text{CAT}} - 1.07 \times 10^{-2} C_{\text{CAT}}^2)\} \quad (R^2 = 0.90) \quad (3-3)$$

$$\text{HQ} : y = 1 - \exp\{-(7.04 \times 10^{-2} C_{\text{HQ}} + 1.32 \times 10^{-3} C_{\text{HQ}}^2)\} \quad (R^2 = 0.98) \quad (3-4)$$

$$\text{CAT+HQ} : y = 1 - \exp\{-(5.57 \times 10^{-2} C_{\text{CAT+HQ}} + 5.17 \times 10^{-3} C_{\text{CAT+HQ}}^2)\} \quad (R^2 = 0.88) \quad (3-5)$$

$$\text{X 線} : y = 1 - \exp\{-(1.70 \times 10^{-1} D_X - 1.42 \times 10^{-1} D_X^2)\} \quad (R^2 = 0.97) \quad (3-6)$$

#### Weibull モデル

$$\text{CAT} : y = 1 - \exp(-9.83 \times 10^{-2} C_{\text{CAT}}^{0.590}) \quad (R^2 = 0.81) \quad (3-7)$$

$$\text{HQ} : y = 1 - \exp(-7.69 \times 10^{-2} C_{\text{HQ}}^{1.00}) \quad (R^2 = 0.98) \quad (3-8)$$

$$\text{CAT+HQ} : y = 1 - \exp(-6.73 \times 10^{-2} C_{\text{CAT+HQ}}^{1.12}) \quad (R^2 = 0.86) \quad (3-9)$$

$$\text{X 線} : y = 1 - \exp(-3.17 \times 10^{-1} D_X^{1.44}) \quad (R^2 = 0.97) \quad (3-10)$$

ここで、

$y$  : 染色体異常発生頻度[-]

$C_X$  : ベンゼン代謝物濃度[ $\mu\text{M}$ ]

$D_X$ : X 線の線量[Gy]

である。

これらの回帰曲線を用いて、染色体異常発生頻度 0~0.2 の範囲で、ある染色体異常発生頻度に対応するベンゼン代謝物濃度及び X 線線量をプロットした。結果を LQ モデル、Weibull モデルそれぞれについて、CAT と X 線との比較結果を図 3-10,3-11 に、HQ と X 線との比較結果を図 3-12,3-13 に、CAT+HQ と X 線との比較結果を図 3-14,3-15 に示し、それぞれのプロットを原点を通る二次曲線で回帰した回帰式を式(3-11)~(3-16)に示す。これらの回帰式はプロットと非常に高い相関を示しており、また、現実的に曝露され得る低濃度域においては線形性が仮定できると考えられるため、ここではそれぞれの回帰式における一次係数をそれぞれのベンゼン代謝物の放射線等価係数とした。すなわち、LQ モデルに基づいた場合、放射線等価係数は CAT で 0.486[Gy/ $\mu$ M], HQ で 0.358[Gy/ $\mu$ M], CAT+HQ で 0.301[Gy/ $\mu$ M]となり、Weibull モデルに基づいた場合、CAT で 0.462[Gy/ $\mu$ M], HQ で 0.429[Gy/ $\mu$ M], CAT+HQ で 0.379[Gy/ $\mu$ M]となった。

### LQ モデル

$$\text{CAT: } D_X = -0.075C_{\text{CAT}}^2 + 0.486C_{\text{CAT}} \quad (R^2 = 1.0) \quad (3-11)$$

$$\text{HQ: } D_X = -0.0322C_{\text{HQ}}^2 + 0.358C_{\text{HQ}} \quad (R^2 = 1.0) \quad (3-12)$$

$$\text{CAT+HQ: } D_X = -0.0153C_{\text{CAT+HQ}}^2 + 0.301C_{\text{CAT+HQ}} \quad (R^2 = 1.0) \quad (3-13)$$

### Weibull モデル

$$\text{CAT: } D_X = -0.0679C_{\text{CAT}}^2 + 0.462C_{\text{CAT}} \quad (R^2 = 0.87) \quad (3-14)$$

$$\text{HQ: } D_X = -0.0564C_{\text{HQ}}^2 + 0.429C_{\text{HQ}} \quad (R^2 = 0.99) \quad (3-15)$$

$$\text{CAT+HQ: } D_X = -0.0388C_{\text{CAT+HQ}}^2 + 0.379C_{\text{CAT+HQ}} \quad (R^2 = 1.0) \quad (3-16)$$

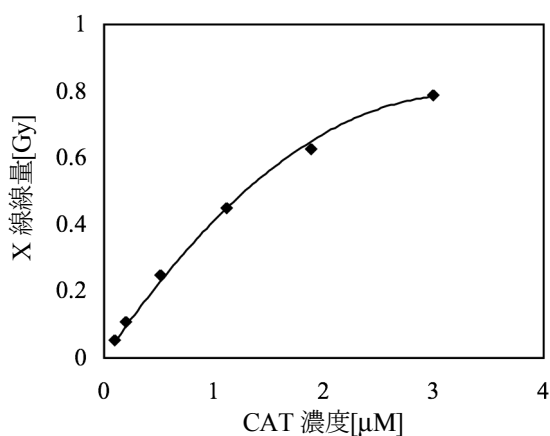


図 3-10 CAT 濃度と X 線線量との関係  
(LQ モデル)

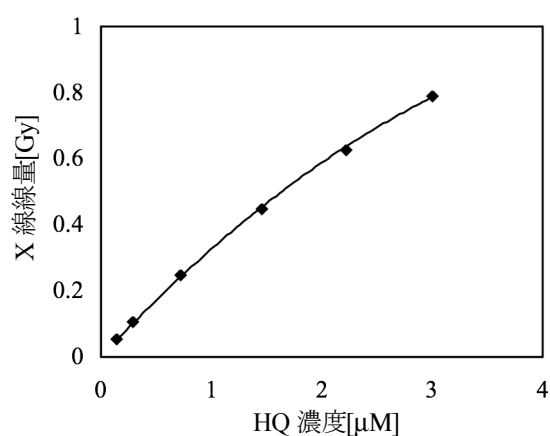


図 3-11 HQ 濃度と X 線線量との関係  
(LQ モデル)

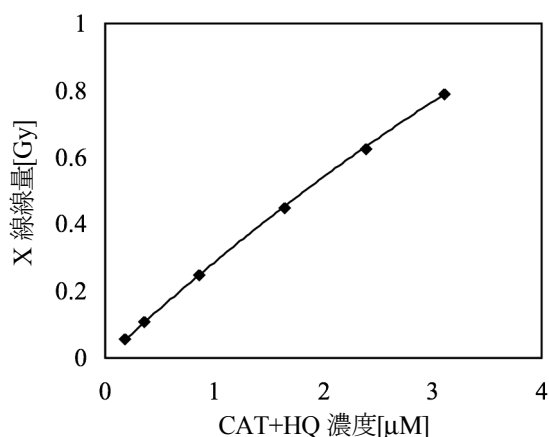


図 3-12 CAT+HQ 濃度と X 線線量との関係  
(LQ モデル)

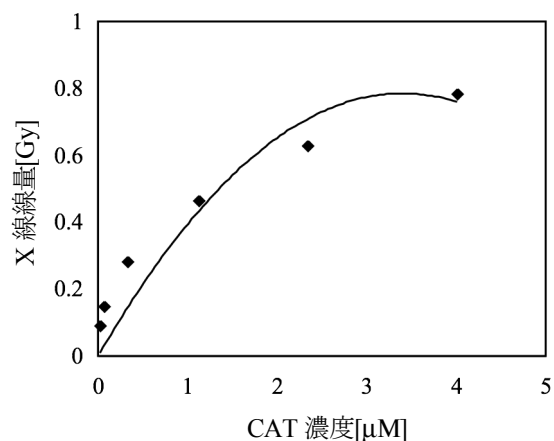


図 3-13 CAT 濃度と X 線線量との関係  
(Weibull モデル)

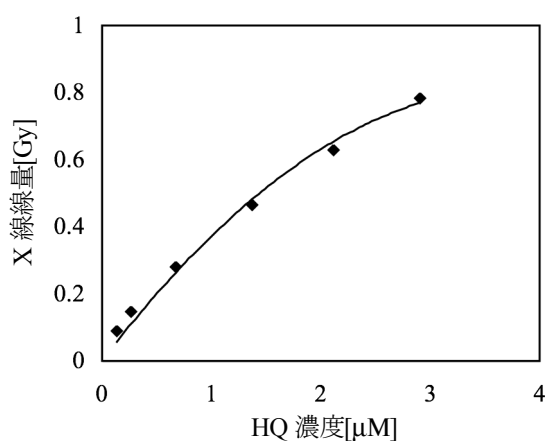


図 3-14 HQ 濃度と X 線線量との関係  
(Weibull モデル)

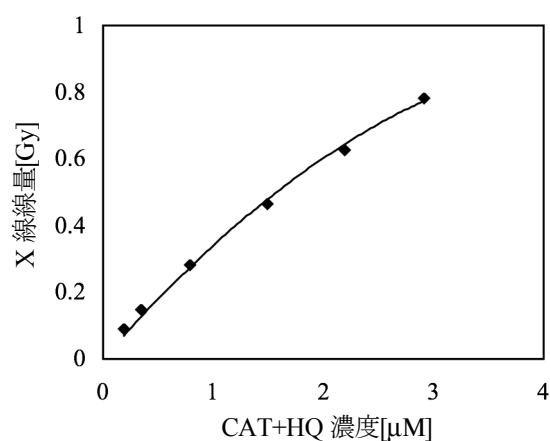


図 3-15 CAT+HQ 濃度と X 線線量との関係  
(Weibull モデル)

### 3-7 考察

本章における細胞毒性試験では、各処理群の細胞数は、CAT 6 $\mu$ M で 82.2%、HQ 6 $\mu$ M で 75.2%、CAT+HQ 6 $\mu$ M で 56.6%、ベンゼン 100 $\mu$ M で 91.5%、X 線 1.5Gy で 52.2%に、それぞれ非曝露群と比べて低下した。また、CAT+HQ 複合曝露群と X 線処理群とでは濃度、線量依存的な生存率の低下が顕著に見られた。その一方で、ベンゼン曝露群においては目立った生存率の低下は観察されなかった。ここで、CAT+HQ 複合曝露群は X 線処理群とほぼ同等の細胞生存率を示しており、CAT+HQ 6 $\mu$ M の曝露では X 線 1.5Gy の照射と同程度の細胞毒性が観察された。また、CAT 6 $\mu$ M、HQ 6 $\mu$ M の単独曝露は X 線 0.5-1.0Gy の照射と同程度の細胞毒性を示した。これらのことから、本実験でベンゼン代謝物と X 線に対して設定した処理濃度、線量の範囲は、それぞれがほぼ同程度の細胞毒性を示す曝露域を含んでおり、ベンゼン代謝物と X 線が細胞に及ぼす影響を比較するにあたって適切な処理条件であったと言える。ベンゼン曝露群において目立った細胞毒性が観察されなかった理由としては、3-2-2-1 で述べたように、ベンゼンが毒性を発現するには酵素による代謝過程を経ることが必要不可欠であり、本実験での曝露処理時間が、ベンゼンが代謝を経て毒性を発現するには充分でなかった可能性

が考えられる。染色体異常試験においてもベンゼンによる用量反応曲線はベンゼン代謝物や X 線によるものと比べて著しく異なる傾向を示しており、このことから本実験で採用した曝露条件が X 線との比較に用いるには適切でなかった可能性が高く、ベンゼン曝露に関しては処理時間や処理濃度を再検討することが必要である。

また、本章における染色体異常試験の結果、染色体異常発生頻度は、非曝露サンプルと比べて、CAT 6 $\mu$ M の処理で 5.5 倍に、HQ 6 $\mu$ M の処理で 19 倍に、CAT+HQ 6 $\mu$ M の処理で 10.5 倍に、ベンゼン 100 $\mu$ M の処理で 4.0 倍に、そして X 線 1.5Gy の処理で 7.3 倍に、それぞれ増加した。ここでも細胞毒性試験で見られたように、ベンゼン代謝物、特に HQ 単独曝露群と CAT+HQ 複合曝露群とでは X 線照射群と類似した用量反応関係が見てとれ、X 線と代謝物間での比較が問題無く行える見込みが立つと言える。その一方で、CAT の 6 $\mu$ M 曝露で 3 $\mu$ M 曝露と比べて Break の発生数が減少しており、また、本試験での Exchange の検出数は極端に少ない。加えて、元来ランダムに発生する機会の多い染色体異常に対して 50 という観察標本数は充分とは言えず、観察標本数を増やした追加実験を行い、再現性を確認することが望まれる。また、本研究で用いたギムザ染色法は特殊なプローブを必要としない簡便な染色法であるが、白血病と特に深く関連するとされる Translocation を検出できない。従って、FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) 法等により Translocation を検出する追加実験を行うことで、発症とより密接に関連する指標による評価が実現できる。

算出した放射線等価係数は、CAT 単独曝露で 0.462[Gy/ $\mu$ M]あるいは 0.486[Gy/ $\mu$ M]と最も大きく、CAT+HQ 複合曝露では 0.301[Gy/ $\mu$ M]あるいは 0.379[Gy/ $\mu$ M]と、CAT, HQ それぞれの単独曝露試験に基づく放射線等価係数の単純和よりも小さな値となった。この結果は、CAT と HQ を複合曝露することにより、それぞれを単独曝露した場合よりも大きな毒性が相乗的に発揮されることを示唆する既存の研究報告[3-33~3-35]とは矛盾するものである。しかしながら、表 3-3 に示したベンゼン代謝物 6 $\mu$ M の曝露による染色体異常の発生頻度を見るに、複合曝露により単独曝露の単純和よりも高頻度で染色体異常が誘発されている。この乖離は低濃度域の解析の不確実性に起因するものであると考えられ、曝露条件を更に低濃度域に設定した実験を行い追加検討を行うことが望まれる。

本章での検討により、ギムザ染色法による染色体異常試験の結果に基づいてベンゼン代謝物の放射線等価係数を決定することができた。一方、先に述べた通り観察標本数の不足や Translocation の検出に関する問題等、より信頼性の高い結果を得るための改善の余地もあり、放射線等価係数の計算手法の再検討も含め、詳細な追加検討が望まれる。

#### 参考文献

- 3-1. Smith M.T.(2010): *Advances in understanding benzene health effects and susceptibility*, *Annual Review of Public Health*, 31, 133-48.
- 3-2. Tucker J.D.(2008): *Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: a review of the major considerations for human biological dosimetry*, *Mutation Research*, 659(3), 211-20.
- 3-3. 佐藤裕子(1993): *血液学ハイライト 血液疾患と染色体異常*, 中外医学社
- 3-4. 国立がんセンター(2006): *がん情報サービス*, <http://ganjoho.jp/public/> (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-5. 国立がんセンター(2010): *最新がん統計*, <http://ganjoho.jp/public/statistics/> (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-6. 森三樹雄(2010): *白血病*, [http://homepage3.nifty.com/mickeym/No.101\\_200/119haketubyou.html](http://homepage3.nifty.com/mickeym/No.101_200/119haketubyou.html) (Accessed Dec 8th, 2010).

- 3-7. Nowell P.C. and Hungerford D.A.(1966): *The etiology of leukemia: some comments on current studies*, *Seminars in Hematology*, 3(2), 114-21.
- 3-8. 血球の分化過程, <http://plaza.umin.ac.jp/~histsite/leukocyte.pdf> (Accessed Jul 15th, 2011).
- 3-9. 製品評価技術基盤機構(2010): 化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0 No.104 ベンゼン, <http://www.safe.nite.go.jp/management/data/104/initrisk.html> (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-10. 環境省(2005): PRTR 法指定化学物質有害性データ : ベンゼン, <http://www.env.go.jp/chemi/prtr/db/preview.php3?serial=299> (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-11. 環境省(2009): 大気汚染防止法の概要, <http://www.env.go.jp/air/osen/law/> (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-12. 環境省(1997): ベンゼン、トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンによる大気の汚染に係る環境基準について, <http://www.env.go.jp/air/kijun/taiki3.html> (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-13. Parke D.V.(1996): *Personal reflections on 50 years of study of benzene toxicology*, *Environmental Health Perspectives*, 104 Supple6, 1123-8.
- 3-14. Sammett D., Lee E.W., Kocsis J.J. and Snyder R.(1979): *Partial hepatectomy reduces both metabolism and toxicity of benzene*, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 5(5), 785-92.
- 3-15. Gut I., Nedelcheva V., Soucek P., Stopka P., Vodicka P., Gelboin H.V. and Ingelman-Sundberg M.(1996): *The role of CYP2E1 and 2B1 in metabolic activation of benzene derivatives*, *Archives of Toxicology*, 71(1-2), 45-56.
- 3-16. Kim S., Vermeulen R., Waidyanatha S., Johnson B.A., Lan Q., Smith M.T., Zhang L., Li G., Shen M., Yin S., Rothman N. and Rappaport S.M.(2006): *Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures*, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15(11), 2246-52.
- 3-17. Seaton M.J., Schlosser P., Bond J.A. and Medinsky M.A.(1994): *Benzene metabolism by human liver microsomes in relation to cytochrome P450 2E1 activity*, *Carcinogenesis*, 15(9), 1799-806.
- 3-18. Sheets P.L., Yost G.S. and Carlson G.P.(2004): *Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1*, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 18(2), 92-9.
- 3-19. Waidyanatha S., Rothman N., Li G., Smith M.T., Yin S. and Rappaport S.M.(2004): *Rapid determination of six urinary benzene metabolites in occupationally exposed and unexposed subjects*, *Analytical Biochemistry*, 327(2), 184-99.
- 3-20. 環境省(2008): リスクコミュニケーションのための化学物質ファクトシート : ピロカテコール, <http://ceis.sppd.ne.jp/fs2008/factsheet/data/1-343.html> (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-21. 化学物質評価研究機構(2002): 化学物質安全性 (ハザード) 評価シート : ピロカテコール, [http://qsar.cerij.or.jp/SHEET/F2000\\_22.pdf](http://qsar.cerij.or.jp/SHEET/F2000_22.pdf) (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-22. Hirose M., Kurata Y., Tsuda H., Fukushima S. and Ito N.(1987): *Catechol strongly enhances rat stomach carcinogenesis: a possible new environmental stomach carcinogen*, *Japanese Journal of Cancer Research*, 78(11), 1144-9.
- 3-23. Oikawa S., Hirose I., Hirakawa K. and Kawanishi S.(2001): *Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol*, *Carcinogenesis*, 22(8), 1239-45.
- 3-24. 環境省(2008): リスクコミュニケーションのための化学物質ファクトシート : ヒドロキノン, <http://ceis.sppd.ne.jp/fs2008/factsheet/data/1-336.html> (Accessed Dec 8th, 2010).
- 3-25. 化学物質評価研究機構(2000): 化学物質安全性 (ハザード) 評価シート : ヒドロキノン, [http://qsar.cerij.or.jp/SHEET/F99\\_19.pdf](http://qsar.cerij.or.jp/SHEET/F99_19.pdf) (Accessed Dec 8th, 2010).

- 3-26. Nakayama A., Noguchi Y., Mori T., Morisawa S. and Yagi T.(2004): *Comparison of mutagenic potentials and mutation spectra of benzene metabolites using supF shuttle vectors in human cells*, *Mutagenesis*, 19(2), 91-7.
- 3-27. do Ceu Silva M., Gaspar J., Duarte Silva I., Leao D. and Rueff J.(2003): *Mechanisms of induction of chromosomal aberrations by hydroquinone in V79 cells*, *Mutagenesis*, 18(6), 491-6.
- 3-28. Stillman W.S., Varella-Garcia M., Gruntmeir J.J. and Irons R.D.(1997): *The benzene metabolite, hydroquinone, induces dose-dependent hypoploidy in a human cell line*, *Leukemia*, 11(9), 1540-5.
- 3-29. Zhang L., Wang Y., Shang N. and Smith M.T.(1998): *Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes*, *Leukemia Research*, 22(2), 105-13.
- 3-30. Chang H.W. and Kim S.Y.(2002): *Detection of chromosome-specific aneusomy and translocation by benzene metabolites in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with DNA probes for chromosomes 5, 7, 8, and 21*, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 65(5-6), 365-72.
- 3-31. Rupa D.S., Schuler M. and Eastmond D.A.(1997): *Detection of hyperdiploidy and breakage affecting the 1cen-1q12 region of cultured interphase human lymphocytes treated with various genotoxic agents*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(2), 161-7.
- 3-32. Smith M.T., Zhang L., Jeng M., Wang Y., Guo W., Duramad P., Hubbard A.E., Hofstadler G. and Holland N.T. (2000): *Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneusomy of chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells*, *Carcinogenesis*, 21(8), 1485-90.
- 3-33. Robertson M.L., Eastmond D.A. and Smith M.T.(1991): *Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes*, *Mutation Research*, 249(1), 201-9.
- 3-34. Levay G. and Bodell W.J.(1992): *Potentiation of DNA adduct formation in HL-60 cells by combinations of benzene metabolites*, *Proceedings of the National Science of the U.S.A.*, 89(15), 7105-9.
- 3-35. Stillman W.S., Varella-Garcia M. and Irons R.D.(1999), *The benzene metabolites hydroquinone and catechol act in synergy to induce dose-dependent hypoploidy and -5q31 in a human cell line*, *Leukemia and Lymphoma*, 35(3-4), 269-81.
- 3-36. Rickert D.E. , Baker T.S., Bus J.S., Barrow C.S. and Irons R.D.(1979): *Benzene disposition in the rat after exposure by inhalation*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 49(3), 417-23.
- 3-37. Muller H.J.(1927): *Artificial transmutation of the gene*, *Science*, 66(1699), 84-7.
- 3-38. Wexler P.(1998): *Encyclopedia of toxicology Vol.3*, Academic Press.
- 3-39. Bertell R.(1984): *Handbook for estimation health effects from exposure to ionizing radiation*, Institute of Concern for Public Health.
- 3-40. BEIR(1980): *The effects on populations of exposure to low levels of ionizing radiation*, National Academy Press.
- 3-41. ICRP(1990): *ICRP Publication 60: 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*, *Annals of the ICRP*, 21(1/3).
- 3-42. 阿部達夫, 藤田弘子(1997): *新染色体異常アトラス*, 南江堂.
- 3-43. JEMS・MMS 分科会(1988): *化学物質による染色体異常アトラス*, 朝倉書店.
- 3-44. Pedersen-Bjergaard J., Christiansen D.H., Desta F. and Andersen M.K.(2006): *Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia*, *Leukemia*, 20(11), 1943-9.



- 3-45. Pedersen-Bjergaard J., Andersen M.K., Andersen M.T. and Christiansen D.H.(2008): *Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia*, *Leukemia*, 22(2), 240-8.
- 3-46. Rothman N., Bechtold W.E., Yin S.N., Dosemeci M., Li G.L., Wang Y.Z., Griffith W.C., Smith M.T. and Hayes R.B. (1998): *Urinary excretion of phenol, catechol, hydroquinone, and muconic acid by workers occupationally exposed to benzene*, *Occupational and Environmental Medicine*, 55(10), 705-11.



は、各代謝反応に相当する代謝速度計算項を、Seaton らがヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験に基づいて構築したモデル式を採用して追加した[4-3,4]。すなわち、ベンゼン及び代謝物の CYP ファミリーによる酵素反応速度の再現にはベンゼン及び代謝物間での CYP2E1 への結合の競合を想定した式(4-28)~(4-31)を、フェノールの硫酸化及び CAT、HQ の抱合体形成速度の再現には Mihaelis-Menten 式に基づく式(4-32)~(4-34)を用いた。また、各パラメータに割り当てた文字の定義を表 4-1 に示す。式(4-1)~(4-34)においては、各コンパートメントを示す添字として、骨髄に対して *BM*, 脂肪に対して *F*, 腎臓に対して *K*, 肝臓に対して *L*, その他の臓器及び組織に対して *O* を、それぞれ用いた。

### Benzene (BZ)

$$\text{Bone marrow : } V_{BM} \frac{dC_{BMBZ}}{dt} = Q_{BM} \left( C_{art,BZ} - \frac{C_{BMBZ}}{P_{BMBZ}} \right) \quad (4-1)$$

$$\text{Fat : } V_F \frac{dC_{FBZ}}{dt} = Q_F \left( C_{art,BZ} - \frac{C_{FBZ}}{P_{FBZ}} \right) \quad (4-2)$$

$$\text{Kidney : } V_K \frac{dC_{KBZ}}{dt} = Q_K \left( C_{art,BZ} - \frac{C_{KBZ}}{P_{KBZ}} \right) - K_{BZ} \cdot C_{KBZ} \quad (4-3)$$

$$\text{Liver : } V_L \frac{dC_{LBZ}}{dt} = Q_L \left( C_{art,BZ} - \frac{C_{LBZ}}{P_{LBZ}} \right) - K_a \cdot D_{oral} \cdot e^{-K_a t} - V_L (R_{BZBO} + R_{BZPH}) \frac{78.11}{1000} \quad (4-4)$$

$$\text{Others : } V_O \frac{dC_{OBZ}}{dt} = Q_O \left( C_{art,BZ} - \frac{C_{OBZ}}{P_{OBZ}} \right) \quad (4-5)$$

$$\text{Arteria : } C_{art,BZ} = \frac{Q \cdot C_{ven,BZ} + Q_A \cdot C_{inh} - Q_A \cdot C_{exh}}{Q + \frac{Q_A}{N}} \quad (4-6)$$

$$\text{Venation : } C_{ven,BZ} = \frac{1}{Q} \sum_i Q_i \cdot \frac{C_{iBZ}}{P_{iBZ}} \quad (4-7)$$

$$\text{Alveoli : } C_{alv} = \frac{C_{art,BZ}}{N} \quad (4-8)$$

$$\text{Exhalation : } C_{exh} = 0.7 \cdot C_{alv} + 0.3 \cdot C_{inh} \quad (4-9)$$

### Phenol (PH)

$$\text{Bone marrow : } V_{BM} \frac{dC_{BMPH}}{dt} = Q_{BM} \left( C_{art,PH} - \frac{C_{BMPH}}{P_{BMPH}} \right) \quad (4-10)$$

$$\text{Liver : } V_L \frac{dC_{LPH}}{dt} = Q_L \left( C_{art,PH} - \frac{C_{LPH}}{P_{LPH}} \right) - V_L (R_{BZPH} - R_{PHPS} - R_{PHCAT} - R_{PHHQ}) \quad (4-11)$$

$$\text{Arteria : } C_{art,PH} = C_{ven,PH} \quad (4-12)$$

$$\text{Venation : } C_{ven,PH} = \frac{1}{Q} \sum_i Q_i \cdot \frac{C_{iPH}}{P_{iPH}} \quad (4-13)$$

### PH sulfate (PS)

$$\text{Liver : } V_L \frac{dC_{LPS}}{dt} = V_L \cdot R_{PHPS} - K_{PS} \cdot C_{LPS} \quad (4-14)$$

$$\text{Excretion : } \frac{dU_{PS}}{dt} = K_{PS} \cdot C_{LPS} \quad (4-15)$$

### CAT

$$\text{Bone marrow : } V_{BM} \frac{dC_{BMCAT}}{dt} = Q_{BM} \left( C_{art,CAT} - \frac{C_{BMCAT}}{P_{BMCAT}} \right) \quad (4-16)$$

$$\text{Liver : } V_L \frac{dC_{LCAT}}{dt} = Q_L \left( C_{art,CAT} - \frac{C_{LCAT}}{P_{LCAT}} \right) - V_L (R_{PHCAT} - R_{CATCATG}) \quad (4-17)$$

$$\text{Arteria : } C_{art,CAT} = C_{ven,CAT} \quad (4-18)$$

$$\text{Venation : } C_{ven,CAT} = \frac{1}{Q} \sum_i Q_i \cdot \frac{C_{iCAT}}{P_{iCAT}} \quad (4-19)$$

### CAT glucuronide (CATG)

$$\text{Liver : } V_L \frac{dC_{LCATG}}{dt} = V_L \cdot R_{CATCATG} - K_{CATG} \cdot C_{LCATG} \quad (4-20)$$

$$\text{Excretion : } \frac{dU_{CATG}}{dt} = K_{CATG} \cdot C_{LCATG} \quad (4-21)$$

### HQ

$$\text{Bone marrow : } V_{BM} \frac{dC_{BMHQ}}{dt} = Q_{BM} \left( C_{art,HQ} - \frac{C_{BMHQ}}{P_{BMHQ}} \right) \quad (4-22)$$

$$\text{Liver : } V_L \frac{dC_{LHQ}}{dt} = Q_L \left( C_{art,HQ} - \frac{C_{LHQ}}{P_{LHQ}} \right) - V_L (R_{PHHQ} - R_{HQHQG}) \quad (4-23)$$

$$\text{Arteria : } C_{art,HQ} = C_{ven,HQ} \quad (4-24)$$

$$\text{Venation : } C_{ven,HQ} = \frac{1}{Q} \sum_i Q_i \cdot \frac{C_{iHQ}}{P_{iHQ}} \quad (4-25)$$

### HQ glucuronide (HQG)

$$\text{Liver : } V_L \frac{dC_{LHQG}}{dt} = V_L \cdot R_{HQHQG} - K_{HQG} \cdot C_{LHQG} \quad (4-26)$$

$$\text{Excretion : } \frac{dU_{HQG}}{dt} = K_{HQG} \cdot C_{LHQG} \quad (4-27)$$

### 代謝速度計算項

$$\text{BZ to BZ oxide (BZO) : } R_{BZBZO} = \frac{F_{BZBZO} \cdot V_E \cdot P_X \cdot C_{LBZ} \frac{1000}{78.11}}{1 + A_{BZ} \cdot C_{LBZ} \frac{1000}{78.11} + A_{PH} \cdot C_{LPH} + A_{CAT} \cdot C_{LCAT} + A_{HQ} \cdot C_{LHQ}} \quad (4-28)$$

$$\text{BZ to PH : } R_{BZPH} = \frac{F_{BZPH} \cdot V_E \cdot P_X \cdot C_{LBZ} \frac{1000}{78.11}}{1 + A_{BZ} \cdot C_{LBZ} \frac{1000}{78.11} + A_{PH} \cdot C_{LPH} + A_{CAT} \cdot C_{LCAT} + A_{HQ} \cdot C_{LHQ}} \quad (4-29)$$

$$\text{PH to CAT : } R_{PHCAT} = \frac{F_{PHCAT} \cdot V_E \cdot P_X \cdot C_{LPH}}{1 + A_{BZ} \cdot C_{LBZ} \frac{1000}{78.11} + A_{PH} \cdot C_{LPH} + A_{CAT} \cdot C_{LCAT} + A_{HQ} \cdot C_{LHQ}} \quad (4-30)$$

$$\text{PH to HQ : } R_{PHHQ} = \frac{F_{PHHQ} \cdot V_E \cdot P_X \cdot C_{LPH}}{1 + A_{BZ} \cdot C_{LBZ} \frac{1000}{78.11} + A_{PH} \cdot C_{LPH} + A_{CAT} \cdot C_{LCAT} + A_{HQ} \cdot C_{LHQ}} \quad (4-31)$$

$$\text{PH to PS : } R_{PHPS} = P_{CYT} \left( \frac{V_{PHPSA} \cdot C_{LPH}}{K_{PHPSA} + C_{LPH}} + \frac{V_{PHPSB} \cdot C_{LPH}}{K_{PHPSB} + C_{LPH}} \right) \quad (4-32)$$

$$\text{CAT to CATG : } R_{CATCATG} = P_{MIC} \left( \frac{V_{CATCATG} \cdot C_{LCAT}}{K_{CATCATG} + C_{LCAT}} \right) \quad (4-33)$$

$$\text{HQ to HQG : } R_{HQHQG} = P_{MIC} \left( \frac{V_{HQHQG} \cdot C_{LHQ}}{K_{HQHQG} + C_{LHQ}} \right) \quad (4-34)$$

表 4-1 各パラメータに割り当てた文字の定義

Symbol	Parameters	unit
$V_i$	Volume of compartment $i$	L
$Q$	Cardiac output	L/min
$Q_A$	Alveolar ventilation rate	L/min
$Q_i$	Blood flow into compartment $i$	L/min
$N$	Partition coefficient of benzene in blood to air	-
$P_{ix}$	Partition coefficient of $x$ in blood to compartment $i$	-
$C_{inh}$	Benzene concentration in inhalation	mg/L or $\mu\text{M}$
$C_{exh}$	Benzene concentration in exhalation	mg/L or $\mu\text{M}$
$C_{alv}$	Benzene concentration in alveoli	mg/L or $\mu\text{M}$
$C_{ix}$	Concentration of $x$ in compartment $i$	mg/L or $\mu\text{M}$
$C_{art,x}$	Concentration of $x$ in arterial blood	mg/L or $\mu\text{M}$
$C_{ven,x}$	Concentration of $x$ in venous blood	mg/L or $\mu\text{M}$
$F_{xy}$	Metabolic proportionality constant of $x$ to $y$	mL/nmol
$V_E$	Microsomal CYP2E1 activity as determined by the method of Koop	nmol/mg-protein/mL
$P_X$	Microsomal Protein concentration used	mg-protein/mL
$A_x$	Affinity of $x$ for CYP2E1	$\mu\text{M}$
$V_{xy}$	Reaction rate constants of $x$ to $y$	nmol/mg-protein/mL
$P_{CYT}$	Amount of cytosol protein	mg-protein/mL
$P_{MIC}$	Amount of microsomal protein	mg-protein/mL
$K_{xy}$	Dissociation constants of $x$ to $y$	$\mu\text{M}$
$K_a$	Gastrointestinal absorption coefficient of benzene	-
$K_x$	Rate constant for the urinary excretion of $x$	/min

#### 4-2-2 パラメータ設定

各組織の重量や血流量といった生理学的パラメータや、ベンゼン及び代謝物の分配係数には、PBPK モデルを用いた既存の研究における報告値を用いた[4-2,5,6]。また、CYP2E1 への親和性や Michaelis-Menten 定数等の代謝及び排泄に関わるパラメータは、主に Seaton らによる *in vitro* 試験のデータに基づいて決定した[4-3,4,7]。しかしながら、これらのヒトのパラメータに関する情報は限られているため、実験値が得られていないパラメータ ( $V_{CATCATG}$  及び  $K_{HQQG}$ ) はパラメータフィッティングにより決定した。なお、一部のパラメータについては、正規分布を仮定して標準偏差を設定することにより、体内動態の個人差を表現した。

本研究で設定した各パラメータの平均値及び標準偏差、参考にした文献の一覧を表 4-2 に示す。

#### 4-2-3 モデルの妥当性の検証

本章で構築したモデルの妥当性を検証するために、いくつかの曝露条件について本モデルを用いてベンゼン及び代謝物の体内動態を計算し、既存の報告における実測値と比較した[4-8~10]。検証に用いたそれぞれのデータの曝露シナリオと元文献の一覧を表 4-3 に、計算値と実測値との比較の結果を図 4-2~5 に示す。なお、表 4-3 中には、それぞれの実験条件によるデータと対応する比較結果の図番号をあわせて記載した。

図 4-2,3,5 に見られる通り、本モデルによる体内動態の評価結果は報告されている実測値とよく一致している。図 4-4 では曝露開始から約 30 時間後以降の計算値は実測値と比べて過小評価となっているが、著しい過小評価は曝露終了後呼気中ベンゼン濃度の計算値が  $10^{-6}\text{mg/L}$  程度のごく低濃度域に低下した際にのみ見てとれ、また、実測データにおけるバックグラウンドや測定機器の精度の限界が影響している可能性も考えられるため、ベンゼン 1ppm または  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  の 70 年間長期曝露を想定する本モデルの実用上は大きな問題とならないと判断した。

次に、ベンゼン 40ppb の 2 時間曝露を行い、曝露開始から曝露終了後 1 時間時点までの CAT 及び HQ の尿中排泄量を測定した Weisel らによる研究報告[4-11]との比較を行った。結果を表 4-4 に示す。表 4-4 に示す通り、本モデルによる計算値は実測値と概ね一致した。

以上の検証から、本モデルはベンゼン曝露によるベンゼン及び代謝物の体内動態を再現するに足るものであると判断し、本モデルを内部曝露量の評価に用いた。

表 4-2 本モデルで設定したパラメータ値の一覧

Parameter		Symbol	Mean	SD	Reference
	Body Weight[kg]	$BW$	70	-	-
Percent of body weight	Bone marrow	$V_{BM}$	4	1.33	4-5
	Fat	$V_F$	25	3.17	4-6
	Kidney	$V_K$	0.4	-	4-2
	Liver	$V_L$	2.45	0.4	4-6
	Others	$V_O$	-	-	-
Flows[L/hr]	Alveolar ventilation	$Q_A$	1.01	0.139	4-2
	Cardiac output	$Q$	340	0.0214	4-2
Percent of cardiac output	Bone marrow	$Q_{BM}$	3.76	0.0187	4-5
	Fat	$Q_F$	8	0.0714	4-6
	Kidney	$Q_K$	15	-	4-2
	Liver	$Q_L$	25	0.04	4-6
	Others	$Q_O$	-	-	-
Partition coefficients of BZ	Blood/air	$N$	8	2.08	4-6
	Bone marrow/blood	$P_{BMBZ}$	18.32	5.34	4-5
	Fat/blood	$P_{FBZ}$	53.15	10.36	4-6
	Kidney/blood	$P_{KBZ}$	2	-	4-2
	Liver/blood	$P_{LBZ}$	2.875	0.2	4-6
	Others/blood	$P_{OBZ}$	2	0.5	4-6
Partition coefficients of PH	Bone marrow/blood	$P_{BMPH}$	2	-	4-2
	Liver/blood	$P_{LPH}$	2	-	4-2
Partition coefficients of CAT	Bone marrow/blood	$P_{BMCAT}$	18	-	4-2
	Liver/blood	$P_{LCAT}$	18	-	4-2
Partition coefficients of HQ	Bone marrow/blood	$P_{BMHQ}$	3	-	4-2
	Liver/blood	$P_{LHQ}$	3	-	4-2
Metabolic constants		$F_{BZPH}$	31.2	-	4-3
		$F_{BZBO}$	0.558	-	4-3
		$F_{PHCAT}$	3.6	-	4-3
		$F_{PHHQ}$	21.6	-	4-3
	Microsomal CYP2E1 activity[nmol/mg/min]	$V_E$	13.038	-	4-3
	Protein concentration[mg-protein/mL]	$P_X$	0.2	-	4-3
		$A_{BZ}$	1	-	4-3
		$A_{PH}$	10	-	4-3
		$A_{CAT}$	4	-	4-3
		$A_{HQ}$	10	-	4-3
		$V_{PHPSA}$	0.225	-	4-4
		$V_{PHPSB}$	3	-	4-4
	Reaction rate constants[nmol/mg-protein/mL]	$V_{CATCATG}$	60	-	fitting
		$V_{HQHQG}$	11.433	-	4-4
	Amount of cytosol protein[mg-protein/mL]	$P_{CYT}$	44.25	-	4-2
	Amount of microsomal protein[mg-protein/mL]	$P_{MIC}$	14.5	-	4-4
		$K_{PHPSA}$	1.4	-	4-4
		$K_{PHPSB}$	220	-	4-4
		$K_{CATCATG}$	746	-	4-2
		$K_{HQHQG}$	746	-	4-4
Absorption	Oral absorption[/hr]	$K_a$	0.032	0.001	4-2
Excretion		$K_{BZ}$	0.001	-	4-7
		$K_{PS}$	0.175	-	4-2
	Rate constants for the urinary excretion[/min]	$K_{CATG}$	0.175	-	4-2
		$K_{HQG}$	0.01	-	fitting

表 4-3 モデルの検証に用いた曝露シナリオ

曝露経路	濃度	曝露期間	測定期間	文献	図
	[ppm]	[min]	[min]		
吸入	25	120	420	4-8	図4-2
吸入	25	120	420	4-8	図4-3
吸入	6.4	480	3600	4-9	図4-4
吸入	57	240	1200	4-10	図4-5

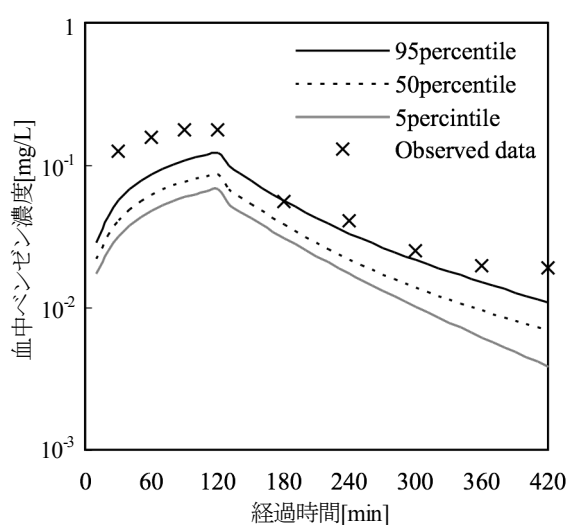


図 4-2 血中ベンゼン濃度の計算値と実測値[4-8]の比較

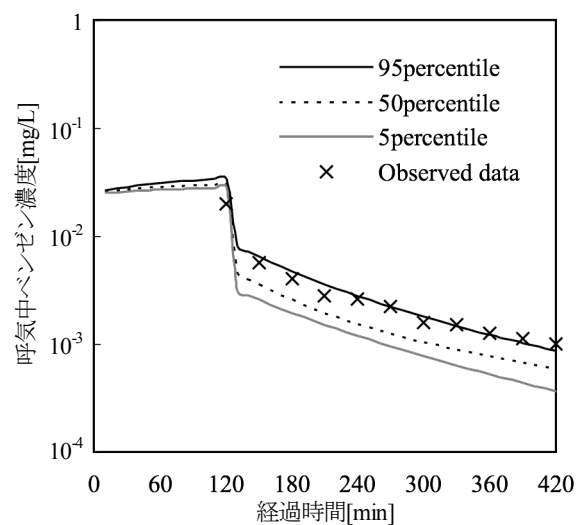


図 4-3 呼気中ベンゼン濃度の計算値と実測値[4-8]の比較

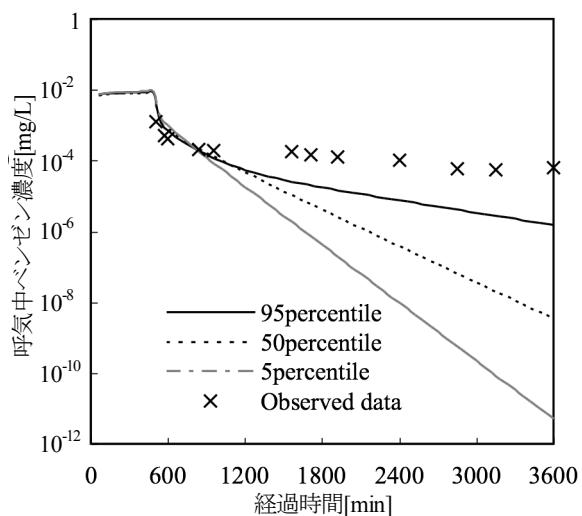


図 4-4 呼気中ベンゼン濃度の計算値と実測値[4-9]の比較

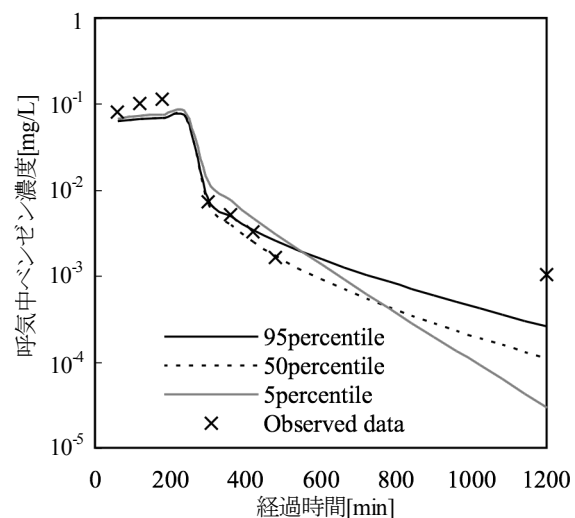


図 4-5 呼気中ベンゼン濃度の計算値と実測値[4-10]の比較



表 4-4 CAT 及び HQ の尿中排泄量の計算値と実測値[4-13]の比較

ベンゼン代謝物	実測値	計算値
CAT	7.2-18 [μg]	3.8-8.3 [μg]
HQ	9.6-20 [μg]	12-27 [μg]

#### 4-2-4 内部曝露量計算結果

本章で構築した PBPK モデルを用いて、骨髓中のベンゼン、CAT 及び HQ 濃度を計算した。想定した曝露シナリオは、大気中濃度 1ppm あるいは 1μg/m<sup>3</sup> のベンゼンによる 70 年間曝露である。各パラメータを平均値に設定した場合の、それぞれの曝露シナリオでの定常状態における骨髓中のベンゼン、CAT 及び HQ 濃度の計算値を表 4-5 に示す。数値計算の結果、骨髓中濃度の計算値は、大気中濃度 1ppm のベンゼン曝露に対しては、ベンゼンで 1.3×10<sup>-1</sup>μM, CAT で 4.2×10<sup>-2</sup>μM, HQ で 2.3×10<sup>-1</sup>μM となり、大気中濃度 1μg/m<sup>3</sup> のベンゼン曝露に対しては、ベンゼンで 4.4×10<sup>-5</sup>μM, CAT で 1.4×10<sup>-5</sup>μM, HQ で 7.8×10<sup>-5</sup>μM となった。

ところで、Rickert らは、ラットを用いて大気中濃度 500ppm のベンゼン曝露による体内動態試験を行い、定常状態における骨髓中のベンゼン及び代謝物濃度を測定している[4-12]。その結果、骨髓中のベンゼン、CAT 及び HQ の濃度の比はおおよそ 3:1:6 であったと報告している。本研究における計算値におけるベンゼン、CAT 及び HQ の濃度比はこの報告とよく一致しており、妥当な結果が得られたと言える。

表 4-5 定常状態における骨髓中ベンゼン及び代謝物濃度

ベンゼン曝露濃度	骨髓中ベンゼン[μM]	骨髓中CAT[μM]	骨髓中HQ[μM]
1ppm	1.3 × 10 <sup>-1</sup>	4.2 × 10 <sup>-2</sup>	2.3 × 10 <sup>-1</sup>
1μg/m <sup>3</sup>	4.4 × 10 <sup>-5</sup>	1.4 × 10 <sup>-5</sup>	7.8 × 10 <sup>-5</sup>

#### 4-3 ベンゼン誘発白血病リスクの評価

本章で計算した内部曝露量及び Chapter 3 で決定した放射線等価係数を用いて、以下の式(4-35)に基づいてベンゼン誘発白血病リスクを評価した。

$$\begin{aligned}
 R_{benzene} &= D_{ex} \cdot R_{radiation} \\
 &= \frac{D_{in}}{OC_{BM}} R_{radiation} \\
 &= \frac{(C_{CAT} \cdot REC_{CAT} + C_{HQ} \cdot REC_{HQ}) \cdot DDREF}{OC_{BM}} R_{radiation}
 \end{aligned} \tag{4-35}$$

ここで、

$R_{benzene}$  : ベンゼン誘発白血病リスク

$R_{radiation}$  : 放射線のリスク係数[-/Gy]

$D_{ex}$  : 全身等価放射線量[Gy]

$D_{in}$  : 骨髓中等価放射線量[Gy]

$OC_{BM}$  : 骨髓の臓器分配係数

$C_X$  : 物質  $x$  の骨髓中濃度[ $\mu\text{M}$ ]

$REC_X$  : 物質  $x$  の放射線等価係数[Gy/ $\mu\text{M}$ ]

DDREF : 線量・線量率効果係数[-]

である。

なお、骨髓の臓器分配係数  $OC_{BM}$  は放射線のエネルギー等によって異なるが、ここでは、0.1MeV-0.25MeV の放射線に対して 0.6-1.4 とする文献値を用いた[4-13]。また、本研究では、放射線等価係数の設定にあたり、ベンゼン及び代謝物の長期曝露による染色体異常試験を行った一方で、放射線照射については高線量 X 線の一括照射を行った。放射線の生体影響は線量及び線量率の低下に伴って減弱することが知られており、その補正のために、線量・線量率効果係数  $DDREF$  (dose and dose rate effectiveness factor) として ICRP (International Commission on Radiological Protection) の推奨値 2 を採用した[4-14]。放射線のリスク係数  $R_{radiation}$  としては、ICRP による赤色骨髓に対するがん死亡生涯リスク  $5.0 \times 10^{-3}$  [-/Sv]を用いた[4-15]。なお、X 線の線質係数は 1 であり、 $1\text{Gy}=1\text{Sv}$  として計算を行った。表 4-6,7 に、式(4-35)に基づくベンゼン誘発白血病リスクの計算過程及び結果を示す。表 4-7 には、本評価の妥当性の検証材料として、ヒト疫学情報に基づくベンゼン誘発白血病リスクの報告値を併記した[4-16,17]。放射線等価係数を用いた評価の結果、ベンゼンにより誘発される白血病の生涯死亡リスクは、大気中ベンゼン 1ppm に対しては  $7.3 \times 10^{-4}$ - $2.0 \times 10^{-3}$  となり、大気中ベンゼン  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  に対しては  $2.5 \times 10^{-7}$ - $6.7 \times 10^{-7}$  となった。

#### 4.4 考察

本章では、PBPK モデルを用いて、大気中ベンゼン 1ppm あるいは  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  に対応する骨髓中ベンゼン及び代謝物濃度を計算した。その結果、骨髓中濃度の計算値は、大気中濃度 1ppm のベンゼン曝露に対しては、ベンゼンで  $1.3 \times 10^{-1}\mu\text{M}$ , CAT で  $4.2 \times 10^{-2}\mu\text{M}$ , HQ で  $2.3 \times 10^{-1}\mu\text{M}$  となり、大気中濃度  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  のベンゼン曝露に対しては、ベンゼンで  $4.4 \times 10^{-5}\mu\text{M}$ , CAT で  $1.4 \times 10^{-5}\mu\text{M}$ , HQ で  $7.8 \times 10^{-5}\mu\text{M}$  となった。ここで得られた骨髓中濃度、す

表 4-6 ベンゼン及び代謝物の骨髓中等価放射線量

大気中ベンゼン濃度	1ppm				$1\mu\text{g}/\text{m}^3$			
物質	CAT		HQ		CAT		HQ	
回帰モデル	LQ	Weibull	LQ	Weibull	LQ	Weibull	LQ	Weibull
骨髓中濃度[ $\mu\text{M}$ ]	$4.2 \times 10^{-2}$		$2.3 \times 10^{-1}$		$1.4 \times 10^{-5}$		$7.8 \times 10^{-5}$	
放射線等価係数[Gy/ $\mu\text{M}$ ]	$4.9 \times 10^{-1}$	$4.6 \times 10^{-1}$	$3.6 \times 10^{-1}$	$4.3 \times 10^{-1}$	$4.9 \times 10^{-1}$	$4.6 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^{-1}$	$4.3 \times 10^{-1}$
骨髓中等価放射線量[Gy]	$4.1 \times 10^{-2}$	$3.9 \times 10^{-2}$	$1.6 \times 10^{-1}$	$2.0 \times 10^{-1}$	$1.3 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-5}$	$5.6 \times 10^{-5}$	$6.7 \times 10^{-5}$

表 4-7 放射線等価係数を用いたベンゼン誘発白血病リスク評価

大気中ベンゼン濃度	1ppm		$1\mu\text{g}/\text{m}^3$	
回帰モデル	LQ	Weibull	LQ	Weibull
骨髓中総等価放射線量[Gy]	$2.1 \times 10^{-1}$		$7.0 \times 10^{-5}$	
全身等価放射線量[Gy]	$1.5 \times 10^{-1}$ - $3.4 \times 10^{-1}$		$5.7 \times 10^{-5}$ - $1.3 \times 10^{-4}$	
白血病リスク計算値	$7.3 \times 10^{-4}$ - $1.7 \times 10^{-3}$		$2.9 \times 10^{-7}$ - $6.7 \times 10^{-7}$	
U.S.EPAによるリスク値[4-18]	$7.1 \times 10^{-3}$ - $2.5 \times 10^{-2}$		$2.2 \times 10^{-6}$ - $7.8 \times 10^{-6}$	
Crumpによるリスク値[4-19]	$8.6 \times 10^{-5}$ - $2.5 \times 10^{-2}$		$2.6 \times 10^{-8}$ - $7.8 \times 10^{-6}$	

なわち内部曝露量と、Chapter 3 で得られた放射線等価係数とを用いてベンゼン誘発白血病リスクを評価した結果、ベンゼンにより誘発される白血病の生涯死亡リスクは、大気中ベンゼン 1ppm に対して  $7.3 \times 10^{-4}$ - $2.0 \times 10^{-3}$  となった。この結果は、U.S.EPA によるリスク値  $7.1 \times 10^{-3}$ - $2.5 \times 10^{-2}$  と比べて約 10 倍程度の過小評価であるものの、その元データとして用いられた Crump による Pliofilm™ コホート研究による報告値の範囲に収まっている [4-16,17]。すなわち *in vitro* 試験に基づく積み上げ型のリスク評価としては良好な評価値が得られたと言え、放射線等価係数を用いたリスク評価の妥当性がある程度示されたと言える。

以下に、本評価法を更に妥当なものとするための改善点を述べる。

Chapter 3 で述べた通り、本評価で放射線等価係数の設定に用いたギムザ染色による染色体異常試験法には検出対象に限界があるため、白血病と深く関連するとされる Translocation を FISH 法により検出する追加実験を行うことで、より発症機構に近い指標での直接的な比較が可能となり、更に妥当な用量反応評価が実現できると考えられる。

次に、本評価ではベンゼン及び代謝物処理と放射線処理とにおける処理時間の差を 2 の DDREF を用いることで補正したが、照射放射線として低線量率  $\gamma$  線を用いることでベンゼン及び代謝物処理と同じ処理時間による *in vitro* 試験が実現でき、不確実な補正に頼らない比較が可能となる。また、本評価では *in vitro* 毒性試験における細胞応答の個人差を考慮していない。しかしながら表 4-7 に示した疫学情報は、人種の偏りこそあるものの曝露条件や感受性に個人差の存在する母集団を対象としており、本評価にも個人差による影響を組み込むことが望まれる。そこで、人種的・個人的由来の異なる様々なヒト正常骨髄細胞を用いた追加検討を行うことで、ベンゼン毒性における細胞応答の個人差を実験的に把握することができ、より柔軟なリスク評価が実現できる。最後に、Chapter 3 でも示した通り、CAT と HQ の複合曝露を行うことで単独曝露の合計とは程度の異なる毒性を示すことが唆されており、様々なベンゼン代謝物の複合曝露が想定される実際のベンゼン誘発白血病リスクを正しく評価するには、複合曝露による影響を考慮する必要がある。従って、ベンゼン毒性に関わる様々な代謝物の複合曝露による毒性試験を行うことで、更に妥当な評価結果が得られると考えられる。なお、その際には、内部曝露量の評価に用いる PBPK モデルにおいても種々の代謝物濃度を計算する必要があり、本章で用いた肝臓での CYP2E1 による代謝や抱合体形成反応のみならず、骨髄での MPO による代謝等を考慮した再検討を行う必要がある。

#### 参考文献

- 4-1. Medinsky M.A.(1995): *The application of physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic (PBPK/PD) modeling to understanding the mechanism of action of hazardous substances*, *Toxicology Letters*, 79(1-3), 185-91.
- 4-2. Igarashi J.(2004): *Risk assessment in leukemia with radiation equivalent coefficient*, *Master's Thesis at Kyoto University Graduate School of Engineering*.
- 4-3. Seaton M.J., Schlosser P., Bond J.A. and Medinsky M.A.(1994): *Benzene metabolism by human liver microsomes in relation to cytochrome P450 2E1 activity*, *Carcinogenesis*, 15(9), 1799-806.
- 4-4. Seaton M.J., Schlosser P. and Medinsky M.A.(1995): *In vitro conjugation of benzene metabolites by human liver: potential influence of interindividual variability on benzene toxicity*, *Carcinogenesis*, 16(7), 1519-27.
- 4-5. Watanabe K.H. and Bois F.Y.(1996): *Interspecies extrapolation of physiological pharmacokinetic parameter distributions*, *Risk Analysis*, 16(6), 741-54.
- 4-6. Brown E.A., Shelley M.L. and Fisher J.M.(1998): *A pharmacokinetic study of occupational and environmental benzene exposure with regard to gender*, *Risk Analysis*, 18(2), 205-13.

- 4-7. Baselt R.C.(1980): in *Biological Monitoring Methods for industrial chemicals*, Biomedical Publications, 37-42.
- 4-8. Sato A., Nakajima T., Fujiwara Y. and Murayama N.(1975): *Kinetic studies on sex difference in susceptibility to chronic benzene intoxication--with special reference to body fat content*, *British Journal of Industrial Medicine*, 32(4), 321-8.
- 4-9. Sherwood R.J.(1972): *Comparative methods of biologic monitoring of benzene exposures [One man's elimination of benzene ( $C_6H_6$ )]*, in *Proceeding of the 3<sup>rd</sup> Annual Conference on Environmental Toxicology*.
- 4-10. Nomiyama K. and Nomiyama H.(1974): *Respiratory elimination of organic solvents in man. Benzene, toluene, n-hexane, trichloroethylene, acetone, ethyl acetate and ethyl alcohol*, *Internationales Archiv für Arbeitsmedizin*, 32(1), 85-91.
- 4-11. Weisel C.P., Park S., Pyo H., Mohan K. and Witz G.(2003): *Use of stable isotopically labeled benzene to evaluate environmental exposures*, *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 13(5), 393-402.
- 4-12. Rickert D.E., Baker T.S., Bus J.S., Barrow C.S. and Irons R.D.(1979): *Benzene disposition in the rat after exposure by inhalation*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 49(3), 417-23.
- 4-13. ICRP(1989): 外部放射線に対する放射線防護に用いるための換算係数, *Japan Radioisotope Association*.
- 4-14. ICRP(2008): *ICRP publication 103: The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*, Elsevier Science.
- 4-15. ICRP(1990): *ICRP publication 60: 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*, Elsevier Science.
- 4-16. U.S.EPA(Environmental Protection Agency)(2008): *Benzene (CASRN 71-43-2)*, *IRIS, Environmental Protection Agency*, <http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm> (Accessed Oct 12th, 2010).
- 4-17. Crump K.S.(1994): *Risk of benzene-induced leukemia: a sensitivity analysis of the pliofilm cohort with additional follow-up and new exposure estimates*, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 42(2), 219-42.

## Chapter 5 マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

### 5-1 本章の目的

白血病をはじめとするがんの発症には多種多様な遺伝子が関与すると考えられており、遺伝子発現変動を網羅的に解析することは、未だ詳細な機構の完全な解明には至っていない発がんを評価するにあたって有用な知見をもたらすことが期待される。そこで本章では、CAT あるいは  $\gamma$  線を曝露したヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup>細胞を対象としてマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現変動解析を行い、その結果をリスク評価に適用する可能性について検討した。具体的には、本章の目的を以下に挙げる2点とした。

1. CAT 曝露細胞と  $\gamma$  線照射細胞とで遺伝子発現変動パターンを比較し、白血病リスク評価のバイオマーカーとなり得る遺伝子群を探索する
2. 複数の異なるドナーに由来する CD34<sup>+</sup>細胞に CAT を曝露して遺伝子発現パターンを比較することで、CAT に対する生体応答の個人差について考察し、その差異を遺伝子発現変動の差異に基づいて定量的に表現する方法を提案する

### 5-2 遺伝子変異と白血病

遺伝子レベルでの変異は白血病をはじめとした発がんの第一段階として非常に重要である。先述の通り白血病では高頻度に特異的な染色体転座が見られるが、染色体転座においては対応する融合遺伝子が形成され、発症に深く関与するとされる。転座により産生される融合遺伝子の代表例としては、t(8;21)における AML1/MTG8、t(12;21)における TEL/AML1、t(15;17)における PML/RAR $\alpha$  などが挙げられる[5-1,2]。

また、白血病関連遺伝子として広く知られているものに FLT3 が挙げられる。FLT3 は造血細胞膜表面に発現するレセプターであり、アポトーシス制御因子、細胞増殖抑制因子、細胞分化制御因子など様々な下流シグナルを制御する。FLT3 変異は AML に最も高頻度に認められる変異であり、下流のシグナル伝達系を異常に活性化することで白血病細胞の異常増殖を招き、AML の病態に深く関わると考えられている[5-3]。

その他に白血病発症に中心的な役割を果たす遺伝子としては、「がん抑制遺伝子」として広く知られる蛋白質 p53 をコードする TP53 や、p21 としても知られる細胞周期調節因子 CDKN1A、アポトーシス制御因子である BAX や CASP4 等、生体内の恒常性維持に寄与する遺伝子群がある。本来生体内ではこういった多彩な遺伝子群の働きにより DNA 損傷が修復あるいは除去されて異常細胞の増殖が抑制されるが、これらの恒常性維持機能が様々な原因で異常をきたすことにより異常が蓄積し、がん化に至ると考えられる[5-4]。

このように白血病の発症には多数の遺伝子群が関与しており、遺伝子発現変動を網羅的に捉えて解析することは、発症機構に即した評価を行う上で実に有用なツールとなり得ると言える。

### 5-3 化学物質のリスク評価における個人差の取り扱い

Chapter1 でも述べた通り、現在の化学物質のリスク評価としては動物実験や疫学調査による有害性評価の結果に基づいて行われるものが主流である。こうしたリスク評価においては実験動物とヒトとの種差やヒトの個人差といった不確実性を考慮することが必要不可欠であり、一般的には、実験動物からヒトへの外挿によって生じる不確実性に対して 10、代謝や感受性の個人差に関して生じる不確実性に対して 10 の不確実係数が用いられている。加えて、動物実験の試験期間や信頼性などの要素についても不確実性を考慮して必要に応じて係数を追加し、それぞれの係数を掛け合わせた不確実係数積を用いることでリスク評価が行われている。また、毒性発現機序を考慮した不確実係数を導入する試みとして、特に主要な代謝経路に着目して薬物動態データに

基づくメタ分析により個々の化学物質ごとに不確実係数を設定する手法が提案されており、盛んに検討が続けられている[5-5]。こうした手法は個人差をより正確に把握して柔軟な対応を取るためにも有効であると言えるが、その適用範囲は未だ限定的であり、代表的な一部の代謝経路に基づいた評価が中心である。実際の毒性発現には代謝酵素遺伝子をはじめ多種多様な遺伝子群が関与しており、毒性発現の個人差はそれらの遺伝子群の発現パターンの違いによるものであると考えられる。従って、個々の化学物質について毒性発現機序に関与する種々の遺伝子群の発現パターンの違いに着目して毒性の現れ方の個人差を定量的に評価することができれば、より妥当な不確実係数の設定に役立てられると言え、柔軟な規制を行うことができる。そこで本章の目的の1つとして、遺伝子発現変動の差異に基づいて毒性発現の個人差を定量的に表現する方法を提案することを掲げ、由来の異なる CD34<sup>+</sup>細胞に CAT を曝露して遺伝子発現パターンを比較することで CAT に対する生体応答の個人差について考察した。

## 5-4 マイクロアレイ

マイクロアレイは DNA チップとも呼ばれ、ガラスやシリコン製の小基盤上に既知の配列を有する数万種類のプローブが高密度に結合している実験装置である。試料中の DNA や RNA を蛍光標識して基盤上にハイブリダイズすると、試料中の DNA あるいは RNA は自身の塩基配列と相補的な塩基配列を有するプローブ部分のみに結合する。従って、各プローブ結合部の蛍光強度を測定することにより、プローブ配列に応じた遺伝子群を個別に検出・定量することができる。DNA マイクロアレイを用いることで、数万から数十万もの膨大な数の遺伝子群の発現を一度に網羅的に解析することが可能となる。

マイクロアレイは蛍光標識に用いる蛍光色素の数により 1 色法と 2 色法とに分類される。1 色法においては各試料を 1 種類の蛍光物質で標識し、1 試料に対して 1 アレイスライドを用いてハイブリダイゼーションを行い、得られた蛍光強度から各アレイスライド間の発現量を比較する。その一方、2 色法においては比較対象とする 2 種類の試料をそれぞれ異なる蛍光物質で標識して同一のアレイスライド上でハイブリダイゼーションを行い、2 色の蛍光強度からサンプル間の発現比を測定する。1 色法は 1 試料につき 1 回のハイブリダイゼーションにより多種多様な組み合わせでの比較が行えるが、ハイブリダイゼーションの条件の差異による結果のばらつきが否めず、アレイスライド間の補正が必要である。一方 2 色法は、2 種類の色素感での補正を必要とするものの、比較対象とする試料間でハイブリダイゼーションの条件を揃えられ、また、同一のアレイスライドを用いることから再現性の点で有利であると言えるが、比較条件毎に対照試料と試験試料とを用意する必要がある。本章ではドナー情報や曝露条件の差異により様々な組み合わせで比較を行う可能性が高いため、1 色法を採用した。

## 5-5 実験方法

### 5-5-1 試薬及び細胞

試薬は特に記載の無い限りは和光純薬（大阪）製の生化学用または試薬特級を用いた。また、マイクロアレイは、CAT 曝露及び非曝露細胞については Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイ（Agilent Technologies, CA）を、 $\gamma$ 線照射及び非照射細胞については Oligo microarray Kit（Human 1A V2（22k）, Agilent Technologies）を用いた。

使用した細胞は Lonza（Switzerland）より購入した Bone Marrow CD34<sup>+</sup> cells であり、そのドナー情報は、CAT 曝露細胞については 26 歳 Asian 男性、26 歳 Black 男性、25 歳 Caucasian 女性、26 歳 Hispanic 男性の 4 種類であり、放射線照射細胞については、カテコール曝露で用いた 26 歳 Hispanic 男性と同一である。解凍した細胞

を Chapter 2 で決定した最適培養条件に従って 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 湿度 100% の条件下で 5 日間培養した後、培養液の半量を新しい培養液と交換して培養を継続、7 日目に細胞が対数増殖期にあることを確認した。

### 5-5-2 曝露処理

培養後の細胞を細胞密度  $6.5 \times 10^4$  cells/mL にて播種し直し、CAT の曝露あるいは  $\gamma$  線の照射を行った。

CAT 曝露サンプルでは、最終濃度が所定の濃度となるように調製した被検物質の水溶液を培養液の 1% 量 (v/v) 加え、37 時間 42 分の曝露処理を行った。曝露処理条件は各ドナーにつき、非曝露及び CAT (東京化成、東京) 6 $\mu$ M の 2 条件とした。

$\gamma$  線照射サンプルでは、照射装置として京都大学放射線生物研究センターの Gammacell® 40 Exactor (Best Theratronics, Canada) を用いて照射処理を行った。線源である放射性核種には <sup>137</sup>Cs を用い、線量率 1.11 Gy/min にて 81 秒間、計 1.50 Gy の  $\gamma$  線照射を行った後、同じ培養液中で 37 時間 42 分の回復培養を行い、CAT 曝露と同一の処理時間とした。なお、非照射細胞群には  $\gamma$  線の照射を行わず、再播種後に 37 時間 42 分の培養のみを行った。

### 5-5-3 RNA の抽出及び純度検定

37 時間 42 分の処理の後、回収した細胞から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, CA) を用いて RNA の抽出を行った。なお、抽出操作はキットに付属のプロトコールに従った[5-6]。以下に手順の概要を示す。

回収した細胞塊に、Buffer RLT (キットに付属) を 350 $\mu$ L 加え、細胞を溶解させた。これを QIA shredder スピンカラムに添加し、20,000g にて 2 分間遠心沈降することで細胞膜等の不純物を除去した。カラムを通過した細胞溶解液に 70% エタノールを 350 $\mu$ L 加えて十分に混和し、RNeasy スピンカラムに添加した。その後 8,000g にて 15 秒間遠心沈降することでスピンカラム内に RNA を吸着させた。その後、不純物を洗浄除去するために Buffer RW1 (キットに付属) を 700 $\mu$ L 加えて 8,000g にて 15 秒間の遠心沈降を行った。続けて 500 $\mu$ L の Buffer RPE (キットに付属) を添加して 8,000g にて 15 秒間の遠心沈降を行った後、再度 500 $\mu$ L の Buffer RPE を加えて 8,000g にて 2 分間遠心沈降し、十分に洗浄を行った。洗浄操作の後、Buffer RPE の残留を防ぐために RNeasy スピンカラムを新しいコレクションチューブに移し、20,000g にて 1 分間の遠心沈降を行った。最後に RNeasy スピンカラムを新しいエッペンチューブに移し、RNase-free water (Life Technologies, CA) を 40 $\mu$ L 添加して 8,000g にて 1 分間の遠心沈降を行い、RNA を溶出させた。

抽出した RNA を pH7.5 の 10mM トリス塩酸バッファーで 5 倍希釈した後、ND-1000 NanoDrop 分光光度計 (NanoDrop products, DE) を用いて吸光波長 230nm, 260nm, 280nm における吸光度  $A_{230}$ ,  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  を測定し、RNA 濃度を算出すると共に抽出した RNA の純度を確認した。

また、泳動バッファーとして TBE を用い、10% TBE アガロースゲルにてゲル 10cm あたり 100V の電圧で 50 分間の電気泳動を行った後、泳動バッファー 100mL あたり 1 $\mu$ L の 10mg/mL エチジウムブロマイド溶液を添加し、40rpm にて 30 分間染色を行った。得られた泳動像を 25w Transilluminator Model TFML-20E (Colonial Scientific, VA) を用いて観察し、得られた RNA の純度検定を行った。

### 5-5-4 RNA のラベル化

抽出した RNA のラベル化、すなわち蛍光標識には T7 RNA ポリメラーゼを用いた増幅法を採用し、Agilent QuickAmp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて Cyanine3-CTP (Cy3-CTP) の取り込みを行った。また、同時に Agilent RNA Spike-In Kit (1 カラー用) (Agilent Technologies) を用いてポジティブコントロールとなる

転写産物を作製した。なお、実験操作は Agilent Technologies の提供するプロトコールに従って行った[5-7]。以下に手順の概要を示す。

まず、Spike-Mix (Spike-In Kit に付属) を Dilution Buffer (Spike-In Kit に付属) で 20 倍に希釈し、更にそれを 25 倍、5 倍と 3 段階で 2500 倍に希釈してポジティブコントロール溶液を作製した。1000ng のサンプル RNA にポジティブコントロール溶液を 5 $\mu$ L、T7 Promoter primer (Labeling Kit に付属) を 1.2 $\mu$ L 添加し、RNase-free water を加えて全量を 11.5 $\mu$ L とした。この混合液を 65 $^{\circ}$ C に設定したヒートティングブロック Dry Thermo Unit DTU-1B (TAITEC, 埼玉) 上で 10 分間熱変性した後、氷上で 5 分間急冷した。次に、表 5-1 に示す組成で試薬を混合して cDNA Master Mix 8.5 $\mu$ L を作製した。なお、表 5-1 に記載した試薬は全て Labeling Kit に付属のものをを用いた。ただし、5x First Strand Buffer は 80 $^{\circ}$ C に設定したウォーターバス中で 4 分間温浴させた後に、ボルテックスミキサーでよく混合してから調製に用いた。また、MMLV-RT と RNase Inhibitor は反応させる直前に混合した。

cDNA の合成は、変性後のサンプル混合液 11.5 $\mu$ L に cDNA Master Mix 8.5 $\mu$ L を加えて十分に混和し、40 $^{\circ}$ C に設定したウォーターバス上で 2 時間インキュベーションすることで行った。その後、65 $^{\circ}$ C に設定したヒートティングブロック上で 15 分間インキュベーションして反応を停止させ、速やかに氷上で 5 分間冷却した。次に、表 5-2 に示す組成で試薬を混合して Cy3 Transcription Master Mix 60 $\mu$ L を作製した。なお、表 5-2 に記載した試薬は RNase-free water を除いて全て Labeling Kit に付属のものをを用いた。ただし、4x Transcription Buffer は 40 $^{\circ}$ C に設定したウォーターバス上で 1 分間温浴させた後に、ボルテックスミキサーでよく混合してから調製に用いた。また、RNase Inhibitor, Inorganic Pyrophosphatase, T7 RNA Polymerase, Cy3-CTP は反応の直前に混合した。

Cy3 の取り込みは、cDNA 合成後のサンプル混合液 20 $\mu$ L に Cy3 Transcription Master Mix 60 $\mu$ L を加えて十分に混和し、40 $^{\circ}$ C に設定したウォーターバス上で 2 時間インキュベーションすることで行った。

反応後、サンプル中に含まれる余分な Cy3 を除くため、サンプルを RNeasy Mini Kit (QIAGEN) によって精製した。以下に手順の概要を示す。ただし遠心沈降操作は装置内の温度を 4 $^{\circ}$ C とした。

Cy3 取り込み後のサンプル混合液 80 $\mu$ L に 20 $\mu$ L の RNase-free water を加えて 100 $\mu$ L とし、そこへ 350 $\mu$ L の Buffer RLT (キットに付属) 及び 250 $\mu$ L の 99.5%エタノールを添加して十分に混和した。この混合液を RNeasy Mini スピнкаラムに添加し、10,000g で 30 秒間の遠心沈降を行った。得られた溶液を洗浄するために RNeasy Mini スピнкаラムに付属の Buffer RPE を 500 $\mu$ L 加えて 10,000g にて 30 秒間の遠心沈降を行い、再度 500 $\mu$ L の

表 5-1 Cy3 cDNA Master Mix の組成

試薬名	試薬量[ $\mu$ L]
5x First Strand Buffer	4.0
0.1M DTT	2.0
10mM dNTP mix	1.0
MMLV-RT	1.0
RNase Inhibitor	0.5
計	8.5

表 5-2 Cy3 Transcription Master Mix の組成

試薬名	試薬量[ $\mu$ L]
RNase-free water	15.3
4x Transcription Buffer	20
0.1M DTT	6
NTP mix	8
50% PEG	6.4
RNase Inhibitor	0.5
Inorganic Pyrophosphatase	0.6
T7 RNA Polymerase	0.8
Cy3-CTP	2.4
計	60.0



Buffer RPE を添加して 10,000g にて 1 分間の遠心沈降を行った。洗浄操作の後、Buffer RPE の残留を防ぐために RNeasy スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、20,000g にて 1 分間の遠心沈降を行った。最後に RNeasy スピнкаラムを新しいエッペンチューブに移して RNase-free water を 30 $\mu$ L 加え、抽出効率を向上させるために 1 分間静置した後 10,000g で 1 分間の遠心沈降を行い、精製後の RNA を溶出させた。

#### 5-5-5 ハイブリダイゼーション

Cy3-CTP ラベル化 RNA とマイクロアレイ上の各 DNA プローブとのハイブリダイゼーションには Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を使い、Agilent Technologies の提供するプロトコールに従って操作を行った[5-8]。以下に手順の概要を示す。

ラベル化 RNA 1.65 $\mu$ g に 10x Blocking Agent (キットに付属) を 11 $\mu$ L 及び 25x Fragmentation Buffer (キットに付属) を 2.2 $\mu$ L 加えた後、RNase-free water を総液量が 55 $\mu$ L となるように加え、ボルテックスミキサーを用いて緩やかに攪拌した。これを 60 $^{\circ}$ C に設定したヒートティングブロック上に 30 分間置くことで cRNA を断片化し、ハイブリダイゼーション効率の向上を図った。30 分後速やかに 25 $\mu$ L の 2x GE Hybridization Buffer HI-RPM (キットに付属) を加え、泡立えないよう注意して十分に混和することで断片化を停止させた。その後、10,000g、室温で 1 分間の遠心分離を行った。

断片化した cRNA 混合液を、ハイブリダイゼーションチャンバー上に設置したガスケットスライドに均一に滴下した後、マイクロアレイスライドを載せて固定した。組み立てたハイブリダイゼーションチャンバーを HYBRIDIZATION INCUBATOR HB-100 (TAITEC, 埼玉) にセットし、65 $^{\circ}$ C, 10rpm にて 17 時間のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後のチャンバーを解体して Agilent Gene Expression Wash Buffer 1 (Agilent Technologies) 中に浸し、液中でアレイスライドとガスケットスライドとを分離した。その後、アレイスライドを新しい Agilent Gene Expression Wash Buffer 1 に浸し、マグネットスターラーで 1 分間穏やかに攪拌して洗浄した。続いてアレイスライドを予め 37 $^{\circ}$ C に温めた Agilent Gene Expression Wash Buffer 2 (Agilent Technologies) に浸し、マグネットスターラーで 1 分間穏やかに攪拌して更に洗浄を行った。洗浄終了後のアレイスライドは後の解析に用いるまでは窒素パージして暗所に保存した。

#### 5-5-6 遺伝子発現量の数値化

スポットの検出には Agilent DNA マイクロアレイスキャナ (Agilent Technologies) を用いた。スキャンモードを eXtended Dynamic Range (XDR) Scan Mode として Hi 100%, Low 10% の設定で検出を行った。取り込んだ各スポットの発現量を数値化ソフトウェア Feature Extraction (Agilent Technologies) を用いて数値化した後、マイクロアレイ解析ソフトウェア Gene SpringGX ver.11 (Agilent Technologies) を用いて遺伝子発現変動解析を行った。

なお、複数のマイクロアレイデータを比較する場合、データ中に混在する生物学的でないノイズや偏りを取り除く必要がある。そこで本章では、Agilent Technologies の推奨する 75 percentile shift を用いてスポット数値の正規化を行った。これは、異なるドナー・曝露条件においても大多数の遺伝子の発現量には大きな差異が生じないという仮定に基づき、各サンプル間でスポット数値の分布の 75 percentile 値が等しくなるよう補正する手法である。それに加えて、シグナルが検出できなかったスポット、不均一なスポット、極端な蛍光強度を示すスポットは異常スポットとして解析対象から除外した。

## 5-6 結果

### 5-6-1 実験系の再現性の確認

#### 5-6-1-1 RNA の抽出及び純度検定

5-5-3 で測定した各サンプルの  $A_{260}$  から、以下の式(5-1)に従ってサンプル中の RNA 濃度を算出した。

$$RNAconc = A_{260} \times a \times D \quad (5-1)$$

ただし、

$RNAconc$  : サンプル RNA 濃度[ng/μL]

$a$  :  $A_{260}=1$  の時の RNA 濃度[ng/μL]

$D$  : 希釈率[-]

であり、本実験においては  $a=40, D=5$  である。

また、5-5-3 で測定した各サンプルの  $A_{230}, A_{260}, A_{280}$  から  $A_{260}/A_{230}$  及び  $A_{260}/A_{280}$  を計算し、RNA 溶液の純度検定を行った。なお、マイクロアレイに用いる RNA としては、 $A_{260}/A_{230}$  が 1.8-2.0 程度、 $A_{260}/A_{280}$  が 2.0 以上である必要があるとされている。表 5-3 に、各サンプルにおける  $A_{230}, A_{260}, A_{280}$  の測定値及び RNA 濃度、 $A_{260}/A_{230}, A_{260}/A_{280}$  の計算値を示す。各サンプルの  $A_{260}/A_{230}$  及び  $A_{260}/A_{280}$  は、概ね良好な値を示していると言える。

表 5-3 各サンプルの RNA 濃度及び純度

ドナー	曝露条件	RNA濃度					
		$A_{230}$	$A_{260}$	$A_{280}$	[ng/μL]	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$
Asian	CAT 0μM	1.36	2.32	1.12	464	1.71	2.07
Asian	CAT 6μM	1.49	3.09	1.48	618	2.07	2.09
Black	CAT 0μM	2.86	5.49	2.60	1098	1.92	2.11
Black	CAT 6μM	1.74	3.42	1.64	684	1.97	2.09
Caucasian	CAT 0μM	1.39	2.56	1.20	512	1.84	2.13
Caucasian	CAT 6μM	0.55	1.18	0.57	236	2.15	2.07
Hispanic	CAT 0μM	0.75	1.37	0.65	274	1.83	2.11
Hispanic	CAT 6μM	1.16	2.30	1.11	460	1.98	2.07
Hispanic	γ線 0Gy	1.43	2.75	1.31	550	1.92	2.10
Hispanic	γ線 1.50Gy	0.76	1.46	0.71	292	1.92	2.06

次に、5-5-3 で行った TBE アガロースゲル電気泳動の結果得られた泳動像を用いてサンプル RNA の純度検定を行った。ここでは、各泳動像において 18SrRNA と 28SrRNA のバンドを検出することができ、かつ、低分子量領域に分解物が見られないことが必要である。また、高純度の RNA を電気泳動した場合、それぞれのバンドの明度の比 28S rRNA/18S rRNA が約 1.5 になる。マイクロアレイに用いる RNA としては、この比の値が 0.9 以上あれば良いとされている。表 5-4 に、各サンプルにおける 18S rRNA 及び 28S rRNA それぞれのバンドの明度の測定結果を示す。各泳動画像中の 28S rRNA/18S rRNA は、Asian, Black, Hispanic 由来細胞では概ね良好な値を示した。その一方、Caucasian 由来細胞では、CAT 0μM 細胞、CAT 6μM 曝露細胞いずれの泳動像においても 18S rRNA 及び 28S rRNA のバンドをほとんど確認できず、RNA の分解が予想された。従って以

降の実験には Caucasian 由来サンプルは用いないこととした。なお、 $\gamma$ 線 0Gy Hispanic 細胞及び  $\gamma$ 線 1.50Gy 照射 Hispanic 細胞では、マイクロアレイ解析に加えて電気泳動を行うだけのサンプル量を確保できなかったため、吸光度による純度検定のみを行って以降の実験に用いた。

表 5-4 18S rRNA 及び 28S rRNA のバンド明度

ドナー	曝露条件	18S rRNA	28S rRNA	28S rRNA/18S rRNA
Asian	CAT 0 $\mu$ M	6671	6842	1.026
Asian	CAT 6 $\mu$ M	6335	5364	0.847
Black	CAT 0 $\mu$ M	11870	12140	1.023
Black	CAT 6 $\mu$ M	15020	16240	1.081
Caucasian	CAT 0 $\mu$ M	305.2	240.1	0.787
Caucasian	CAT 6 $\mu$ M	237.6	120.5	0.507
Hispanic	CAT 0 $\mu$ M	14970	14300	0.955
Hispanic	CAT 6 $\mu$ M	11420	14960	1.31

#### 5-6-1-2 ラベル化による Cy3-CTP 取り込み効率計算結果

5-5-4 で得られたラベル化 cRNA は、ND-1000 NanoDrop 分光光度計を用いて吸光波長 260nm, 550nm における吸光度  $A_{260}$ ,  $A_{550}$  を測定し、以下の式(5-2)~(5-4)に従って cRNA 濃度を測定すると共に Cy3-CTP の取り込み効率を算出した。

$$cRNAconc = A_{260} \times b \times \frac{1[cm]}{l} \quad (5-2)$$

$$Cy3-CTPconc = \frac{A_{550} \times 1000}{c \times l} \quad (5-3)$$

$$Cy3-CTPincorporation = \frac{Cy3-CTPconc \times 1000}{cRNAconc} \quad (5-4)$$

ただし、

$cRNAconc$  : サンプル cRNA 濃度[ng/ $\mu$ L]

$b$  :  $A_{260} = 1$  の時の cRNA 濃度[ng/ $\mu$ L]

$l$  : 吸光光度計の光路長[cm]

$Cy3-CTPconc$  : サンプル中 Cy3-CTP 濃度[pmol/ $\mu$ L]

$c$  : Cy3-CTP 濃度 1mM, 光路長 1cm の時の吸光度  $A_{550}$ [-/mM/cm]

$Cy3-CTPincorporation$  : Cy3-CTP 取り込み効率[pmol/ $\mu$ g]

であり、本実験においては  $b = 40$ ,  $l = 0.1$ ,  $c = 150$  である。

算出した各サンプルの cRNA 濃度と Cy3-CTP 取り込み効率を表 5-5 に示す。マイクロアレイに用いるサンプルとしては Cy3-CTP 取り込み効率が 9[pmol/ $\mu$ g]以上であることが必要とされる。ここで得られた取り込み効率は、 $\gamma$ 線 0Gy Hispanic 細胞で 8.67[pmol/ $\mu$ g]と 9 未満の値を示したが、概ね良好な値を示している。従って、

表 5-5 に示したサンプル群は Cy3-CTP の十分な取り込みが確保できていると判断してマイクロアレイに用いた。すなわち、最終的にマイクロアレイに用いた細胞は、Asian, Black, Hispanic の 3 ドナーの CAT 曝露及び非曝露細胞、そして Hispanic 由来の  $\gamma$  線照射及び非照射細胞である。

表 5-5 各サンプルにおける cRNA 濃度及び Cy3-CTP 取り込み効率

ドナー	曝露条件	$A_{260}$	$A_{550}$	cRNA濃度 [ng/ $\mu$ L]	Cy3-CTP濃度 [pmol/ $\mu$ L]	Cy3-CTP取り込み効率 [pmol/ $\mu$ g]
Asian	CAT 0 $\mu$ M	0.64	0.062	256	4.13	16.15
Asian	CAT 6 $\mu$ M	1.11	0.105	444	7.00	15.77
Black	CAT 0 $\mu$ M	0.95	0.092	380	6.13	16.14
Black	CAT 6 $\mu$ M	1.13	0.089	452	5.93	13.13
Hispanic	CAT 0 $\mu$ M	1.43	0.103	572	6.87	12.00
Hispanic	CAT 6 $\mu$ M	1.68	0.116	672	7.73	11.51
Hispanic	$\gamma$ 線 0Gy	0.50	0.026	200	1.73	8.67
Hispanic	$\gamma$ 線 1.50Gy	0.18	0.012	72	0.80	11.11

### 5-6-1-3 サンプル間の類似性の検討

本章では、Asian の CAT 曝露細胞で 2 枚、Asian の CAT 非曝露細胞、Black 及び Hispanic の CAT 曝露及び非曝露細胞の計 5 条件で各々 3 枚ずつ、Hispanic の  $\gamma$  線照射及び非照射細胞ではそれぞれ 1 枚ずつのアレイスライド解析結果を得た。以降では、Asian の CAT 非曝露サンプルを Ae1-3 とし、以下同様に、Asian の CAT 曝露サンプルを Ae1-2, Black の CAT 非曝露サンプルを Be1-3, Black の CAT 曝露サンプルを Be1-3, Hispanic の CAT 非曝露サンプルを He1-3, Hispanic の CAT 曝露サンプルを He1-3, Hispanic の  $\gamma$  線非照射サンプルを Hni,  $\gamma$  線照射サンプルを Hi とする。

まず、発現変動解析に先立ち、CAT 曝露及び非曝露細胞群、 $\gamma$  線照射及び非照射細胞群のそれぞれの条件内でのアレイ間の発現量分布の相関関係を計算した。CAT 曝露及び非曝露細胞群における相関係数の計算結果を表 5-6 に示す。また、Hni と Hi との相関係数は 0.943 であった。

表 5-6 CAT 曝露及び非曝露細胞における各サンプル間の相関係数

	Ac 1	Ac 2	Ac 3	Ae 1	Ae 2	Bc 1	Bc 2	Bc 3	Be 1	Be 2	Be 3	Hc 1	Hc 2	Hc 3	He 1	He 2	He 3
Ac 1	1.000	0.989	0.988	0.873	0.893	0.875	0.866	0.880	0.923	0.906	0.925	0.922	0.921	0.923	0.951	0.953	0.956
Ac 2		1.000	0.995	0.874	0.895	0.877	0.869	0.883	0.928	0.910	0.931	0.928	0.929	0.929	0.957	0.961	0.963
Ac 3			1.000	0.876	0.901	0.883	0.872	0.890	0.932	0.911	0.935	0.936	0.936	0.937	0.963	0.966	0.968
Ae 1				1.000	0.991	0.970	0.971	0.969	0.929	0.930	0.927	0.930	0.917	0.927	0.908	0.903	0.905
Ae 2					1.000	0.979	0.977	0.980	0.946	0.943	0.945	0.949	0.938	0.947	0.929	0.925	0.927
Bc 1						1.000	0.995	0.997	0.969	0.961	0.965	0.964	0.955	0.960	0.933	0.929	0.930
Bc 2							1.000	0.995	0.962	0.959	0.960	0.955	0.945	0.951	0.923	0.920	0.921
Bc 3								1.000	0.972	0.965	0.971	0.969	0.961	0.966	0.938	0.936	0.937
Be 1									1.000	0.983	0.998	0.981	0.979	0.979	0.963	0.964	0.965
Be 2										1.000	0.983	0.960	0.956	0.959	0.940	0.940	0.942
Be 3											1.000	0.979	0.978	0.978	0.963	0.964	0.965
Hc 1												1.000	0.997	0.998	0.979	0.981	0.981
Hc 2													1.000	0.996	0.978	0.982	0.980
Hc 3														1.000	0.978	0.980	0.981
He 1															1.000	0.996	0.996
He 2																1.000	0.998
He 3																	1.000

マイクロアレイに用いた RNA 量は全てのアレイで 1.65 $\mu$ g と等しく、また、大多数の遺伝子は曝露または照射によってもその発現量が変動しないと考えられるので、ゲル間の相関係数は高い値となることが期待される。ここで、表 5-6 に示した通り、CAT 曝露及び非曝露群における相関係数の計算値は 0.866-0.998 と比較的高い値を示しており、特に、同一個体由来細胞、同一曝露条件内での相関係数は 0.983-0.998 と非常に高い値を示した。また、 $\gamma$ 線照射及び非照射細胞に関しても各条件 1 サンプルながらも 0.943 と高い相関を示した。従って実験誤差の影響は小さいと考え、実験の再現性に大きな問題は無く、発現変動解析を行うに足ると判断した。

## 5-6-2 白血病マーカー候補遺伝子群の探索

### 5-6-2-1 カテコール曝露と $\gamma$ 線照射に共通する発現変動遺伝子群の抽出

白血病マーカー候補遺伝子群の探索として、共通ドナーである Hispanic 由来細胞の CAT 曝露サンプルと  $\gamma$ 線照射サンプルとで遺伝子発現変動パターンを比較することで CAT 曝露と  $\gamma$ 線照射に共通する発現変動遺伝子群を抽出した。発現量の比較には正規化後のスポット数値を用い、サンプルが複数存在する CAT 曝露及び非曝露サンプルについては 3 サンプルのスポット数値の平均値をその曝露条件における遺伝子発現量とした。Hispanic 由来細胞の CAT 曝露サンプルと非曝露サンプル、あるいは  $\gamma$ 線照射サンプルと非照射サンプルとの間で遺伝子発現量に 1.5 倍以上の差が確認されたスポットを発現変動遺伝子として抽出した。その結果、CAT 曝露により発現量が変化したスポットが 2180 スポット、 $\gamma$ 線の照射により発現量が変化したスポットが 2242 スポット検出された。それらの内 60 のスポットは CAT 曝露と  $\gamma$ 線照射の両者に共通して発現量が増加し、39 のスポットは CAT 曝露と  $\gamma$ 線照射の両者に共通して発現量が減少した。共通して発現量が増加した遺伝子群を表 5-7 に、共通して発現量が減少した遺伝子群を表 5-8 に示す。なお、表中には fold 値として、CAT 曝露サンプルあるいは  $\gamma$ 線照射サンプルにおける対象遺伝子の発現量の、非曝露サンプルあるいは非照射サンプルにおける対象遺伝子の発現量に対する比を付記した。

### 5-6-2-2 パスウェイ解析

次に、5-6-2-1 で抽出した 99 の遺伝子群に生物学的な意義を見出すため、各遺伝子の相互作用や生化学的パスウェイとの関連を視覚的に把握することのできるパスウェイ解析を行った。Gene SpringGX ver.11 のパスウェイ解析では、これまでに発表された論文をその内容の信頼度から 1-10 点に点数化し、9 点以上の論文が 1 件以上あるいは 8 点以下の論文が 3 件以上認められる遺伝子の関係性を採用し、各遺伝子の関係を線で結んだ模式図が作成される。なお、参照したデータベースは Agilent Technologies の提供する Human relations database である。

まず、対象遺伝子群同士に推測される直接的な相互関係のみに着目して行う、“Direct Interactions”アルゴリズムに基づくパスウェイ解析の結果を図 5-1 に示す。次に、対象遺伝子群同士の相互関係に加えて対象遺伝子群と直接作用すると考えられる生化学的パスウェイを追加して行う、“Expand Interactions”アルゴリズムに基づくパスウェイ解析の結果を図 5-2 に示す。また、図 5-1, 2 中の各要素や各要素間の関係性を示す記号群の定義を図 5-3 に示す。なお、図 5-1, 2 中の青枠で囲った要素は 99 の対象遺伝子群に含まれる遺伝子を示しており、また、有効な関係性が検出されず、他の要素と連結されなかった孤立した遺伝子群は図 5-1, 2 の解析結果からは除外した。

表 5-7 CAT 曝露及び $\gamma$ 線照射に共通して 1.5 倍以上発現量が増加した遺伝子群

Symbol	Gene name	fold by CAT	fold by $\gamma$ -ray
SPP1	secreted phosphoprotein 1	2.4182	1.6219
ASB16	ankyrin repeat and SOCS box-containing 16	2.1368	2.8277
MT2A	metallothionein 2A	2.1005	1.6179
LYPLA1	lysophospholipase I	2.0487	1.7293
GNAZ	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide	1.9819	3.0248
RPS19	ribosomal protein S19	1.9021	1.7792
AGRP	agouti related protein homolog (mouse)	1.8979	5.5126
CDKAL1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	1.8587	1.5535
TMED2	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2	1.8327	1.7409
GNG10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	1.8167	1.6105
TP53TG1	TP53 target 1 (non-protein coding)	1.7896	1.9384
FAM104B	family with sequence similarity 104, member B	1.7754	1.8876
CIR1	corepressor interacting with RBPJ, 1	1.7662	1.6597
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	1.7644	1.6048
COX6C	cytochrome c oxidase subunit VIc	1.7601	1.6671
ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2	1.7303	1.6653
LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	1.7145	2.1041
ATP5L	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G	1.7112	1.6997
S100A6	S100 calcium binding protein A6	1.6954	2.4080
RPS21	ribosomal protein S21	1.6765	1.9287
COX7C	cytochrome c oxidase subunit VIIc	1.6624	1.5107
AHNAK	AHNAK nucleoprotein	1.6542	2.5139
APOC1	apolipoprotein C-I	1.6413	3.2244
NDUFA8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa	1.6386	1.5802
ATP6V1F	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F	1.6158	1.6856
MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	1.6092	2.2652
C12orf62	chromosome 12 open reading frame 62	1.6027	1.7121
MDH1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	1.5923	1.5886
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	1.5869	1.8540
C9orf89	chromosome 9 open reading frame 89	1.5858	1.5099
PAIP2	poly(A) binding protein interacting protein 2	1.5839	1.6770
RPP21	ribonuclease P/MRP 21kDa subunit	1.5814	1.7053
PPM1N	protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1N (putative)	1.5778	1.5249
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	1.5771	1.6428
CD69	CD69 molecule	1.5770	1.7284
BRI3	brain protein I3	1.5738	1.5228
NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1	1.5715	2.1511
OSTM1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1	1.5696	4.0523
NDUFA6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa	1.5587	2.0120
ANXA4	annexin A4	1.5491	1.9802
BRP44L	brain protein 44-like	1.5445	2.0461
SLC38A6	solute carrier family 38, member 6	1.5409	2.2376
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	1.5403	1.7429
B3GALT4	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 4	1.5336	2.3474
CCNG1	cyclin G1	1.5325	1.7954
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	1.5306	1.5104
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	1.5255	2.3228
SFT2D1	SFT2 domain containing 1	1.5253	1.7284
MEA1	male-enhanced antigen 1	1.5227	1.8257
AIF1	allograft inflammatory factor 1	1.5207	1.5551
HIST1H3E	histone cluster 1, H3e	1.5204	1.5577
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1.5203	1.5146
ELL2	elongation factor, RNA polymerase II, 2	1.5133	1.6055
BLVRA	biliverdin reductase A	1.5124	1.5048
NFU1	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog (S. cerevisiae)	1.5094	2.2004
RPS14	ribosomal protein S14	1.5067	1.5752
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	1.5066	2.0788
TMEM191A	transmembrane protein 191A	1.5055	13.1481
HSPC159	galectin-related protein	1.5053	1.7405
GDF15	growth differentiation factor 15	1.5013	5.0376

表 5-8 CAT 曝露及び $\gamma$ 線照射に共通して 1.5 倍以上発現量が減少した遺伝子群

Symbol	Gene name	fold by CAT	fold by $\gamma$ -ray
CACNA1E	calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit	0.2710	0.2079
SYN1	synapsin I	0.3308	0.3585
NDOR1	NADPH dependent diflavin oxidoreductase 1	0.3699	0.2956
KIFC3	kinesin family member C3	0.3956	0.5543
MGC45922	hypothetical LOC284365	0.4033	0.5216
DHX38	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38	0.4065	0.6512
MYH14	myosin, heavy chain 14, non-muscle	0.4072	0.4487
CMIP	c-Maf-inducing protein	0.4329	0.1651
NEUROG3	neurogenin 3	0.4350	0.3872
EN2	engrailed homeobox 2	0.4416	0.2391
SYNGR4	synaptogyrin 4	0.4500	0.5063
ZNF341	zinc finger protein 341	0.4532	0.5584
CDH24	cadherin 24, type 2	0.4552	0.3823
DLGAP3	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 3	0.5088	0.3550
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	0.5393	0.5078
KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	0.5575	0.5141
PARP10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	0.5592	0.2212
SLC34A3	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 3	0.5603	0.3804
SF3A2	splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa	0.5645	0.2683
PRR24	proline rich 24	0.5721	0.4118
PRPF8	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (S. cerevisiae)	0.5775	0.6577
GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	0.5800	0.4354
BCAM	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)	0.5927	0.4703
NRN1	neuritin 1	0.5948	0.3617
HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)	0.5991	0.4142
CKAP5	cytoskeleton associated protein 5	0.6127	0.5845
ERCC3	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	0.6238	0.5930
LCE1A	late cornified envelope 1A	0.6245	0.4601
KISS1R	KISS1 receptor	0.6283	0.5494
RHBDL1	rhomboid, veinlet-like 1 (Drosophila)	0.6287	0.2559
VPS11	vacuolar protein sorting 11 homolog (S. cerevisiae)	0.6310	0.6322
TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	0.6315	0.6352
DNM1P35	DNM1 pseudogene 35	0.6341	0.4586
ZSCAN10	zinc finger and SCAN domain containing 10	0.6355	0.5138
NUP98	nucleoporin 98kDa	0.6425	0.5893
BOD1L	biorientation of chromosomes in cell division 1-like	0.6521	0.3780
ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	0.6637	0.5883
NAT10	N-acetyltransferase 10 (GCN5-related)	0.6658	0.5874
CD79A	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	0.6658	0.4083

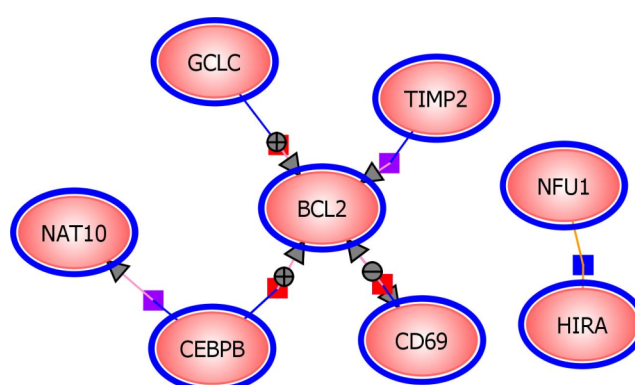


図 5-1 “Direct Interactions”アルゴリズムによるパスウェイ解析結果

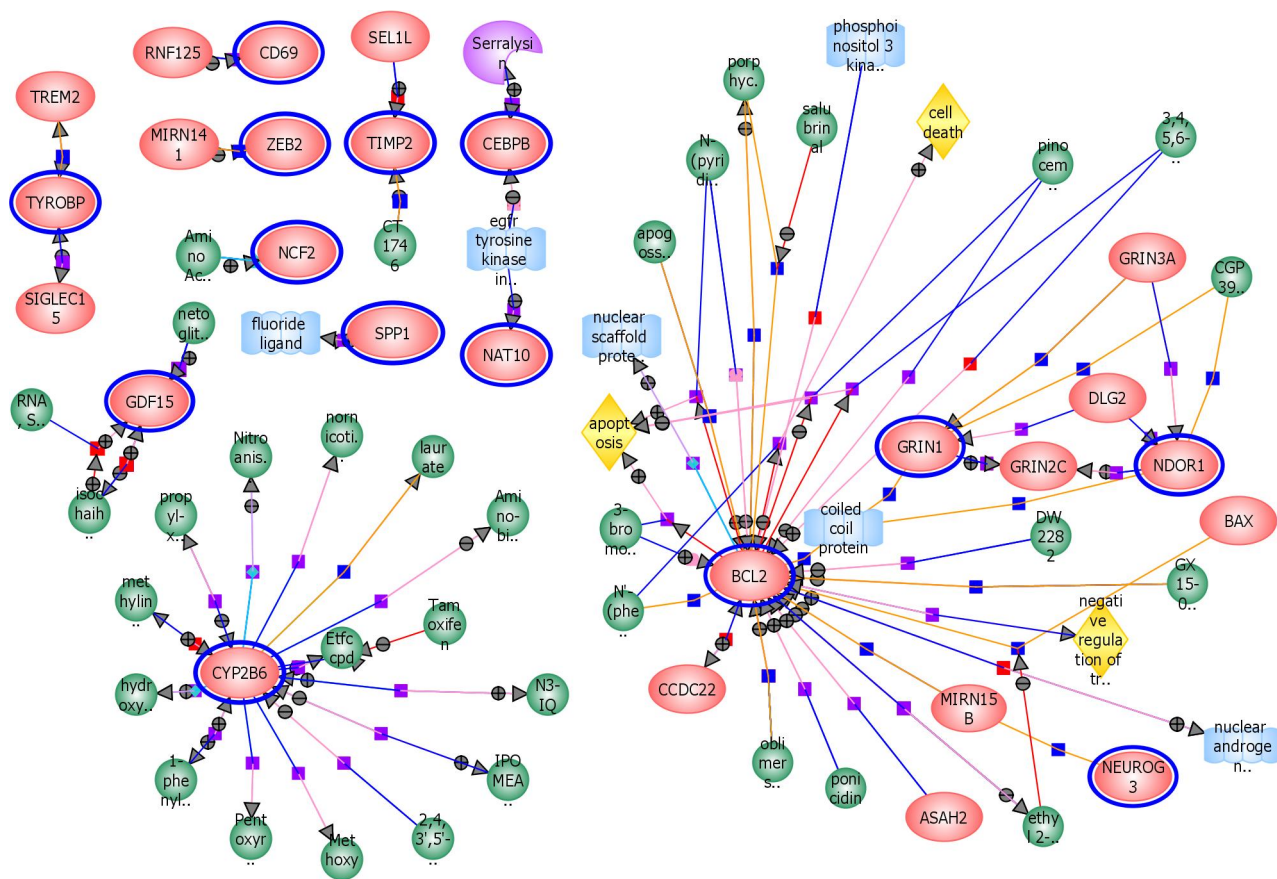


図 5-2 “Expand Interactions”アルゴリズムによるパスウェイ解析結果

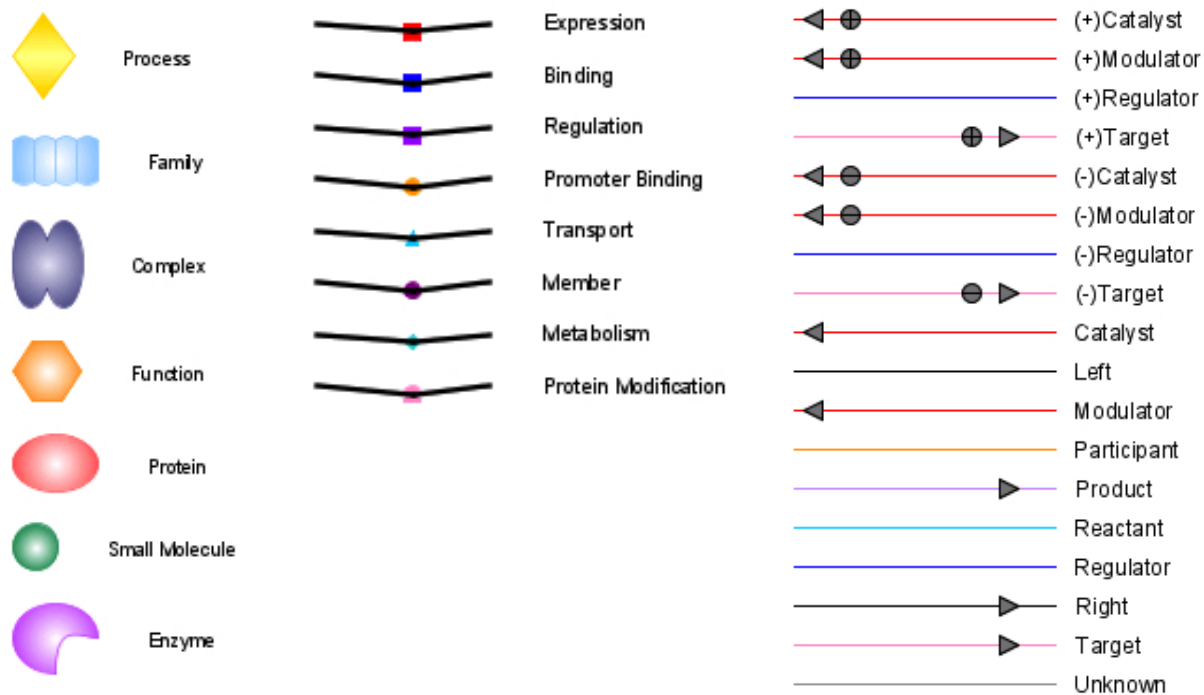


図 5-3 パスウェイ解析結果図に用いた記号群の定義



### 5-6-3 遺伝子発現変動解析結果に基づく個人差の定量評価法の提案

#### 5-6-3-1 本章で提案する評価法の概要

白血病をはじめとする種々の毒性の発現には多種多様な遺伝子群が関与しており、毒性発現の個人差はそれら毒性関連遺伝子群の発現パターンの違いによるものであると考えられる。そこでここでは、Asian, Black, Hispanic の3ドナーのCD34<sup>+</sup>細胞にCAT曝露が及ぼす遺伝子発現変動パターンを比較することでCATに対する生体応答の個人差について考察し、その差異を遺伝子発現変動の差異に基づいて定量的に表現する方法を提案する。

CAT はベンゼンの代謝物として白血病発症に深く関与する[5-9]が、その毒性の直接の担い手は最終代謝物であるキノン体であり、個々の代謝活性の差異は毒性発現の個人差に大きく寄与すると考えられる。ここで、図 5-4 にベンゼンの主な代謝経路及び関与する代謝酵素を示す[5-10~5-14]。生体内に摂取されたベンゼンは、CYP2E1 や MPO 等の働きにより、フェノールから HQ, CAT を経てキノン体へと代謝される。また、CAT を含む水酸基を持ったベンゼン代謝物は硫酸抱合体、あるいはグルクロン酸抱合体を形成して体外へ排出される。そのため、CYP2E1 や MPO の発現は CAT の毒性を活性化させ、UGT1A8, SULT1A1 の発現は CAT の毒性を不活性化させると考えられる。

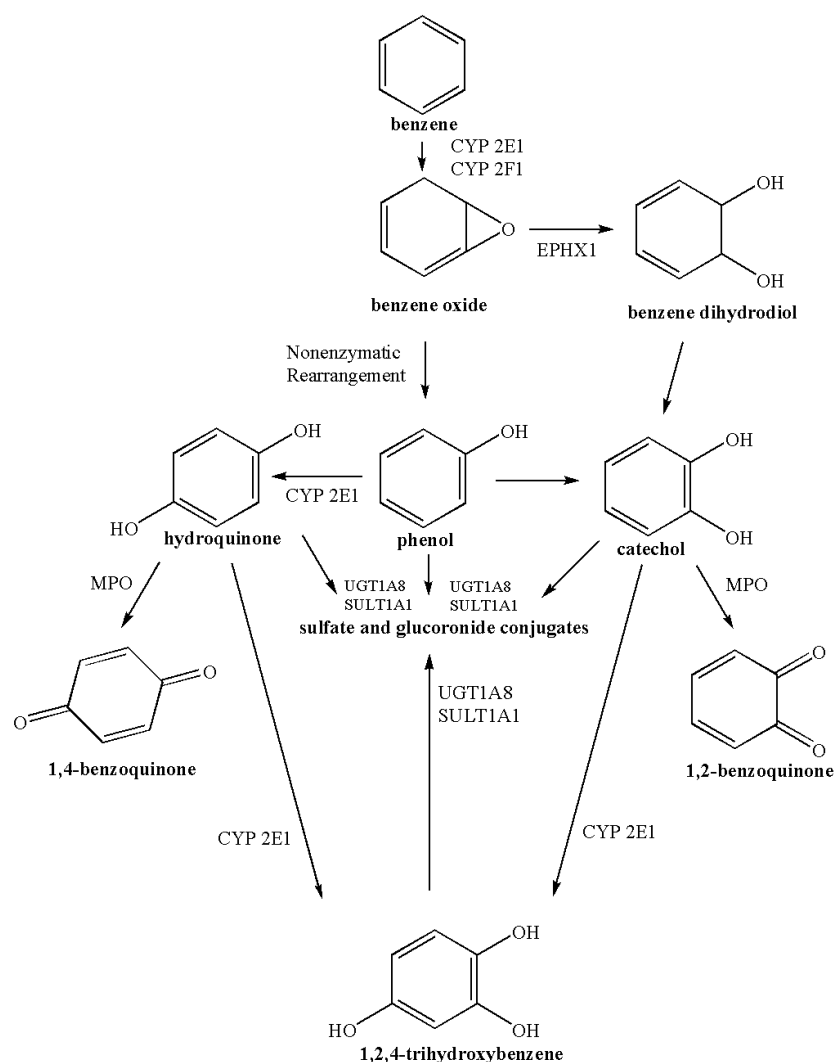


図 5-4 ベンゼンの主な代謝経路及び関与する代謝酵素

ベンゼン代謝物の毒性発現には代謝以外にも様々な生化学的パスウェイが関わりとされており、Yoon らはマウスの骨髄を用いた cDNA マイクロアレイの結果からそのメカニズムを提案している[5-4]。図 5-5 に Yoon らの提案するメカニズムの模式図を示す。Yoon らによると、先に述べた CYPs や MPO 等による代謝によりキノン体が生成されると共に ADH4 や COX, GSTM1 等の発現増加を伴う酸化ストレスが発生し、DNA 損傷を誘発する。DNA 損傷に対する応答としてがん抑制遺伝子 TP53 が発現し、CCNG1, CDKN1A, DNAJC1, GADD45A, RB1 等の細胞周期調節因子に作用することで細胞周期を停止させる。その一方で TP53 はアポトーシス制御因子である ARL1, BAX, CASP4 にも働きかけ、異常細胞の細胞死を誘導し、ATRX, RAD50, RAD51 による DNA 修復が行われる。こうした TP53 を中心とした一連の防御機構が正常な作用を失うことによりベンゼン代謝物の悪影響が顕在化すると考えられ、その原因としては DNA 修復ミスや関連遺伝子の変異、BCL2 等のがん原遺伝子の過剰発現による機能阻害等が考えられる。

ここで挙げた遺伝子群は CAT の毒性評価に重要であり、それらの発現変動蛍光の個人差は CAT の毒性に対する感受性の個人差と密接に関わっていると考えられる。そこで、これら毒性発現に関連する遺伝子の発現強度及び CAT 曝露による fold 値を用いて、細胞に由来する、CAT の毒性に対する感受性を数値化することを試みる。

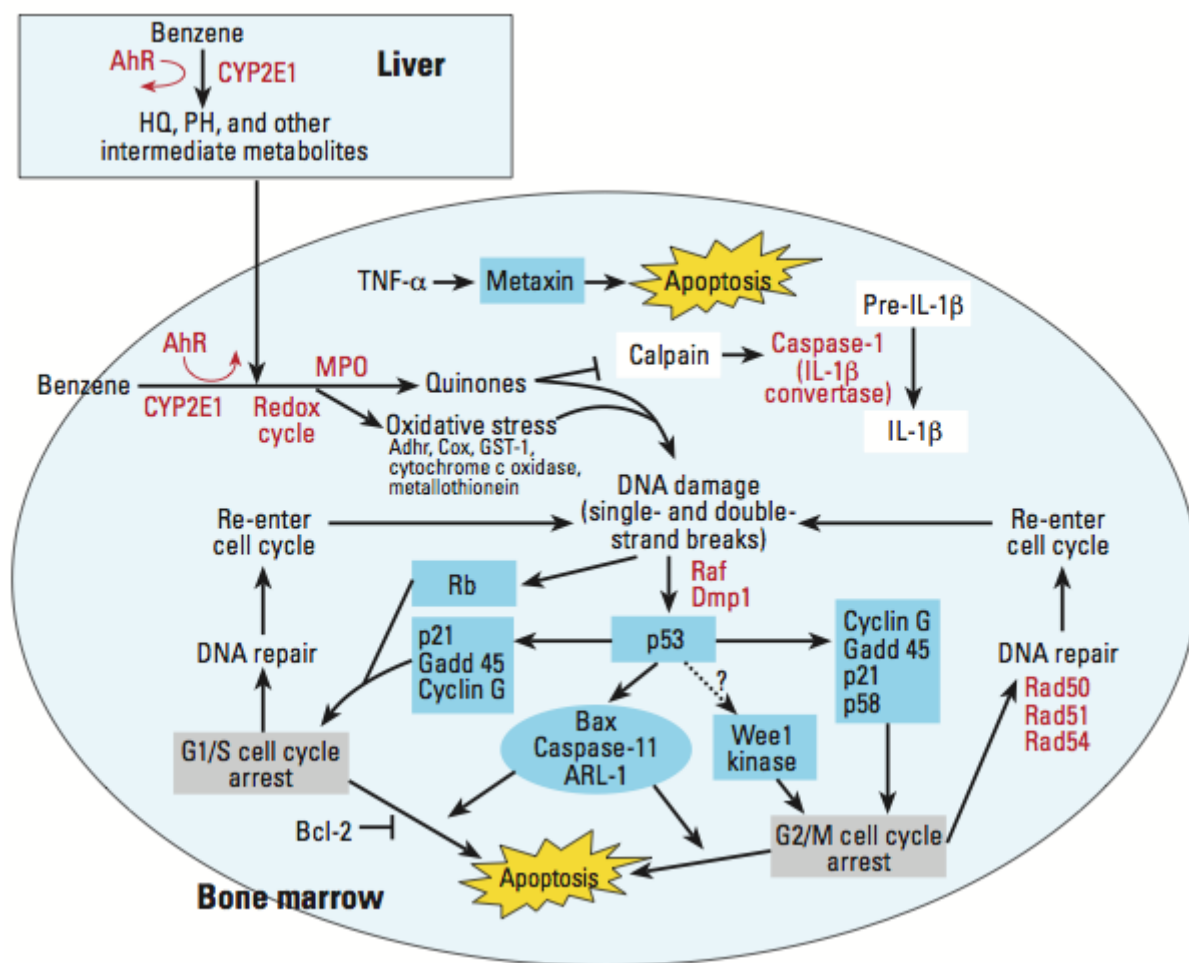


図 5-5 Yoon らによるベンゼン及び代謝物の毒性発現メカニズム (出典文献 : [5-4])

本評価で用いた遺伝子群及びその機能分類を表 5-9 に示す。上述したメカニズムを踏まえ、これらの毒性関連遺伝子群による毒性への寄与を大きく 2 種類に分け、毒性に直接関与する最終代謝物や活性酸素種などのストレス因子の生成による寄与と、それらストレスに対する感受性の寄与とを考える。ここで、代謝活性化遺伝子群及び酸化ストレス関連遺伝子群はストレス因子の増加に寄与するあるいはその指標となると考え、これらの遺伝子群の発現傾向から式(5-5)に基づいてカテコールの毒性活性化指数 (Toxic Activation Index)  $I_{TA}$  を計算した。逆に抱合体形成遺伝子群はストレス因子の減少に寄与すると考え、その発現傾向から式(5-6)に基づいて毒性不活性化指数 (Toxic Deactivation Index)  $I_{TD}$  を算出した。同様に、防御機構関連遺伝子群の発現はストレス因子に対する細胞の抵抗性を向上させると考えてその発現傾向から式(5-7)に基づき抵抗性活性化指数 (Resistibility Activation Index)  $I_{RA}$  を算出し、がん原遺伝子群の発現は細胞の抵抗性を減退させると考え、その発現傾向から式(5-8)に基づいて抵抗性不活性化指数 (Resistibility Deactivation Index)  $I_{RD}$  を計算した。なお、それぞれの指数の計算にあたっては、各遺伝子間の機能に複雑な階層構造及び相互作用が予想され、遺伝子毎に毒性への寄与率が異なると考えられる。しかし、現時点ではそれらの全てを忠実にモデル化し得るだけの知見が不足しているため、本研究では一手法の提案として、それぞれの指数計算に扱う遺伝子は全て毒性に同等に寄与すると仮定して分類毎の遺伝子の総発現強度の fold 値から指数を計算する、ごく簡易なモデル式(5-5)~(5-8)を構築した。

表 5-9 評価に用いた遺伝子群

機能分類	遺伝子
代謝活性	AHR
	CYP2E1
	MPO
抱合体形成	SULT1A1
	UGT1A8
酸化ストレス	ADH4
	COX5B
	COX7A2
	GSTM1
	MT1A
防御機構 (細胞周期)	CCNG1
	CDKN1A
	DNAJC3
	GADD45A
	RB1
防御機構 (アポトーシス)	TP53
	WEE1
	ARL1
	BAX
	CASP4
防御機構 (DNA修復)	ATRX
	RAD50
	RAD51
がん原遺伝子	BCL2
	FOS
	JUN
	RAB21

$$I_{TA} = \frac{\sum A_{ex}}{\sum A_{cx}} \quad (5-5)$$

$$I_{TD} = \frac{\sum D_{ex}}{\sum D_{cx}} \quad (5-6)$$

$$I_{RA} = \frac{\sum R_{ex}}{\sum R_{cx}} \quad (5-7)$$

$$I_{RD} = \frac{\sum O_{ex}}{\sum O_{cx}} \quad (5-8)$$

ただし、式(5-5)~(5-8)において、

$A_{cx}$  : 代謝活性化及び酸化ストレス関連遺伝子の非曝露群における発現強度

$A_{ex}$  : 代謝活性化及び酸化ストレス関連遺伝子の曝露群における発現強度

$D_{cx}$  : 抱合体形成遺伝子の非曝露群における発現強度

$D_{ex}$  : 抱合体形成遺伝子の曝露群における発現強度

$R_{cx}$  : 防御機構関連遺伝子の非曝露群における発現強度

$R_{ex}$ ：防御機構関連遺伝子の曝露群における発現強度

$O_{ex}$ ：がん原遺伝子の非曝露群における発現強度

$O_{ex}$ ：がん原遺伝子の曝露群における発現強度

である。

算出した4種類の指数を用いて、細胞の由来によるカテコールの感受性指数（Sensitivity Index）を式(5-9)に基づいて算出した。ここでもそれぞれの寄与の相互作用に応じた様々な従属関係が予測されるが、全ての指数が感受性に独立に寄与すると仮定して各指数の比及び積によって Sensitivity Index を表現した。

$$Sensitivity\ Index = \frac{I_{TA}}{I_{TD}} \times \frac{I_{RD}}{I_{RA}} \quad (5-9)$$

### 5-6-3-2 評価結果

表 5-9 に示した対象遺伝子群について、3 ドナーそれぞれの CAT 非曝露群及び曝露群それぞれにおける発現強度及び fold 値を表 5-10 に示す。これらの値を用い、式(5-5)~(5-9)に基づいて CAT 毒性に対する感受性を数値化した。その結果を表 5-11 に示す。

表 5-10 CAT 曝露による遺伝子発現変動解析結果

遺伝子	Asian			Black			Hispanic		
	非曝露群	曝露群	fold	非曝露群	曝露群	fold	非曝露群	曝露群	fold
AHR	3.1877	2.1349	0.6697	2.0257	2.0269	1.0006	1.5911	1.7050	1.0716
CYP2E1	0.0093	0.0161	1.7331	0.0340	0.0364	1.0719	0.0115	0.0088	0.7640
MPO	230.9433	279.9407	1.2122	421.9500	321.3438	0.7616	233.1504	268.4264	1.1513
SULT1A1	1.3830	1.9378	1.4012	4.7666	3.9869	0.8364	0.7516	0.6720	0.8941
UGT1A8	0.0051	0.0056	1.0842	0.0036	0.0031	0.8557	0.0042	0.0055	1.3078
ADH4	0.0052	0.0037	0.7154	0.0035	0.0029	0.8400	0.0038	0.0047	1.2519
COX5B	66.2483	55.1620	0.8327	51.5102	40.1128	0.7787	62.9397	93.5177	1.4858
COX7A2	84.4583	66.4612	0.7869	55.0379	43.9591	0.7987	56.9262	79.8527	1.4027
GSTM1	0.2513	0.3386	1.3474	0.6389	0.5249	0.8216	0.3363	0.2957	0.8795
MT1A	39.2401	24.2210	0.6173	28.3468	14.6242	0.5159	19.7451	47.3145	2.3963
CCNG1	9.4562	4.3683	0.4620	3.9184	5.8035	1.4811	6.0120	9.2202	1.5336
CDKN1A	3.3985	4.7402	1.3948	1.7289	3.2544	1.8823	3.1708	2.0496	0.6464
DNAJC3	3.1118	2.8298	0.9094	2.3004	2.2618	0.9832	2.4656	1.9783	0.8024
GADD45A	8.8470	6.3594	0.7188	3.1642	7.9789	2.5216	5.3442	5.0489	0.9447
RB1	8.1766	5.4497	0.6665	4.7276	5.8922	1.2464	5.3699	6.4607	1.2031
TP53	0.0841	0.1729	2.0552	0.2887	0.3250	1.1256	0.2231	0.1393	0.6245
WEE1	0.3234	0.3018	0.9331	0.5165	0.5568	1.0781	0.3582	0.3605	1.0066
ARL1	4.0396	2.1788	0.5394	1.8799	2.1307	1.1334	2.2684	3.2680	1.4407
BAX	5.6231	8.6763	1.5430	8.5873	4.3789	0.5099	8.0564	7.0844	0.8794
CASP4	53.6915	40.4349	0.7531	31.0860	27.9034	0.8976	33.3383	47.9696	1.4389
ATRX	0.3736	0.3070	0.8216	0.2522	0.2799	1.1098	0.2162	0.2124	0.9825
RAD50	1.9048	1.7816	0.9353	1.7146	1.7598	1.0264	1.6552	1.2158	0.7345
RAD51	8.6616	6.9566	0.8032	8.1079	7.3574	0.9074	8.9840	11.9837	1.3339
BCL2	1.7288	2.0475	1.1843	1.9649	1.1062	0.5630	1.0396	0.7610	0.7320
FOS	16.2196	11.8073	0.7280	13.1159	27.9426	2.1304	16.5799	26.0103	1.5688
JUN	15.9106	14.7393	0.9264	3.3775	8.3697	2.4781	6.8414	11.3061	1.6526
RAB21	3.8595	2.5124	0.6509	2.4869	3.2210	1.2952	2.2367	2.7912	1.2479

表 5-11 感受性定量評価結果

	Asian	Black	Hispanic
Toxic Activation Index	1.0093	0.7553	1.3107
Toxic Deactivation Index	1.4000	0.8364	0.8964
Resistibility Activation Index	0.7852	1.0236	1.2521
Resistibility Deactivation Index	0.8247	1.9403	1.5308
Sensitivity Index	0.7572	1.7118	1.7876

## 5-7 考察

### 5-7-1 白血病マーカー候補遺伝子群の探索

5-6-2 では、同一ドナーのヒト骨髄に由来する CD34<sup>+</sup>細胞を CAT あるいは  $\gamma$  線で処理して RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的発現変動解析を行った。その結果、表 5-7 に示した 60 個の遺伝子では CAT 曝露と  $\gamma$  線照射の両者に共通して発現量が増加し、表 5-8 に示した 39 個の遺伝子では CAT 曝露と  $\gamma$  線照射の両者に共通して発現量が減少した。これら 99 の遺伝子の内、特に白血病発症と関連が深いと考えられる注目すべき遺伝子としては、BCL2, NUP98, CCNG1, CYP2B6 が挙げられる。

がん原遺伝子として知られる BCL2 はミトコンドリア外膜タンパク質をコードする遺伝子であり、リンパ球などにおいてアポトーシスによる細胞死を阻害する[5-15]。BCL2 については様々な発がんとの関連が報告されており、白血病関連では特に、14 番染色体上の IgH との相互転座 t(14;18)が濾胞性 B 細胞リンパ腫に特徴的な相互転座として広く知られている[5-16]。また、急性白血病の薬剤療法における標的分子としても盛んに研究が続けられている[5-17~5-19]。

NUP98 は核膜孔に存在するタンパク質であるヌクレオポリンの一種をコードする遺伝子であり、核内外の双方向の物質輸送を媒介する役割を担う。また、11 番染色体上に位置する NUP98 は急性骨髄性白血病や T 細胞急性リンパ球性白血病において様々な遺伝子と融合し、特徴的な相互転座を形成することが知られている。その代表例としては、5 番染色体上の NSD1 との相互転座 t(5;11), 7 番染色体上の HOXA9 との相互転座 t(7;11), 8 番染色体上の WHSC1L1 との相互転座 t(8;11), 17 番染色体上の PHF23 との相互転座 t(11;17), 20 番染色体上の TOP1 との相互転座 t(11;20)等が挙げられる[5-20~5-24]。

CCNG1 がコードするタンパク質はサイクリンの一種であり、サイクリン依存性キナーゼの活性を調節して細胞周期を制御することで細胞増殖に関わる。DNA 損傷への応答における G2/M 期での細胞周期停止に関与する他、p53 の機能を媒介することで細胞増殖を阻害することでも知られる。また、急性白血病患者で CCNG1 の発現量が対照群と比べ有意に高いことが報告されており、白血病発症との関わりが示唆されている[5-25]。

CYP2B6 はシトクロム P450 ファミリーに属する代謝酵素の一つで、コレステロールやステロイド、脂肪酸など、様々な薬剤の肝臓での代謝に関与することが知られている。CYP2B6 は白血病発症との関連性も注目されており、近年 CYP2B6 の遺伝子多型と白血病に対する感受性との関連も報告されている[5-26,27]。

以上の遺伝子群については白血病との関わりを示唆する報告例も多く、白血病リスクを評価するにあたって有力なマーカー候補であると言える。

続いて、5-6-2-2 では、5-6-2-1 で抽出した 99 個の遺伝子群に生物学的な意義を見出すため、パスウェイ解析を行った。その結果、“Direct Interactions”アルゴリズムに基づく解析結果である図 5-1、“Expand Interactions”アルゴリズムに基づく解析結果である図 5-2 の両者に共通して、BCL2 を中心とした生化学的パスウェイが特に顕著に検出された。先述の通り BCL2 はアポトーシス阻害因子として古くから白血病をはじめとした様々な発

がんとの関連が報告されている重要な遺伝子である。一般には BCL2 の発現量の過剰増加が異常細胞のアポトーシスを抑制した結果発がんに至るとされているが、本試験において CAT の曝露及び X 線照射に共通して BCL2 の発現量が低下したことは、曝露及び照射のストレスに対する防御応答として BCL2 を不活性化させることで異常細胞のアポトーシスを誘発していると考えられ、がん発症に至る前の段階のストレスを鋭敏に検出するマーカーとして BCL2 を用いることができる可能性があると言える。今後、サンプル数を増やした追加実験を行ってより信頼性の高い結果を得ることが望ましい。また、qPCR (quantitative polymerase chain reaction) 法を用いた定量試験を行う等して BCL2 を中心とした生化学的パスウェイと白血病発症との関連性を探ると共に、BCL2 等の遺伝子群のバイオマーカーとしての可能性をより詳細に検討したい。

#### 5-7-2 遺伝子発現変動解析結果に基づく個人差の定量評価法の提案

5-6-3 では、Asian, Black, Hispanic の 3 種類のドナーに由来する細胞間での遺伝子発現パターンを比較することで、CAT 曝露に対する生体応答の個人差を定量的に表現することを試みた。

まず、表 5-9 に示した 27 の対象遺伝子群の発現変動に関しては、CCNG1, GADD45A, ARL1, BAX, BCL2, FOS, JUN の 7 遺伝子について、Asian と Black とで fold 値に 2 倍以上の差が見られた。また同様に、Asian と Hispanic とで fold 値に 2 倍以上の差が見られたものとしては CYP2E1, MT1A, CCNG1, CDKN1A, TP53, ARL1, FOS の 7 遺伝子が挙げられ、Black と Hispanic とでは MT1A, CDKN1A, GADD45A の 3 遺伝子の fold 値に 2 倍以上の差が見られた。このようにカテコール毒性に関連が強いとされる遺伝子群の発現変動パターンには Asian, Black, Hispanic のそれぞれで大きな差異があり、こうした発現変動の差異がカテコールの毒性に対する感受性の個人差を評価するにあたって非常に重要であることが示唆される。

ここで、現在のリスク評価における個人差としての不確実係数 10 は  $3.16$  (代謝能力)  $\times 3.16$  (感受性の差) であると説明されている。この  $3.16$  という値は、その集団の感受性分布が対数正規分布で表現される場合、その幾何標準偏差が  $1.5$  であれば母集団の  $98\%$  を、幾何標準偏差が  $2.7$  であれば母集団の  $88\%$  をカバーする値である[5-28]。本研究で得られた Sensitivity Index の数値は、Asian 由来 CD34<sup>+</sup>細胞に比べて Black 由来 CD34<sup>+</sup>細胞で  $2.26$  倍、Hispanic 由来 CD34<sup>+</sup>細胞で  $2.36$  倍カテコールの毒性に対して敏感に反応していることを示唆していると言え、既存の不確実係数の範囲内の値となった。また、この結果は白血病の発症率は概してアジア人で低い傾向にあるとする疫学情報と一致する[5-29]。しかしながら、本評価で用いた細胞の由来は 3 ドナー全て 26 歳男性で共通しており、基礎疾患の有無は不明である。実際の社会構成においては、人種の差に加えて性別の差、年齢の構成の分布、基礎疾患の有無といったものがその個人差を生む要因として考えられるため、本研究で得られた感受性の差を既存の不確実係数や疫学情報と直接比較することは難しく、その妥当性を示すには慎重な追加検討を重ねる必要がある。以下に本評価の妥当性を検証するための今後の課題及び展望を列挙する。

まず、本研究で用いた細胞の由来は 26 歳男性の Asian, Black, Hispanic それぞれ 1 種類ずつのみであり、本評価で得られた感受性の差が個人差によるものか人種差によるものか断定できない。従って今後、より多くの由来の細胞を用いて同様の実験を行うことで、信頼性が高く統計的な意義を見出し得るデータを蓄積する必要がある。また、併せて本研究で提案する Sensitivity Index の、感受性指標としての妥当性を示すためには、同じ由来の細胞を用いて従来の毒性指標に基づく *in vitro* 試験を行い、その結果に見られる個体差と Sensitivity Index との間の相関関係について考察することが考えられる。例えば、CAT を曝露した際の活性酸素種の発生量をそれぞれの細胞で測定して比較することで、Toxic Activation Index 及び Toxic Deactivation Index の妥当性を検証する。また、染色体異常試験や小核形成試験といった複数の遺伝毒性試験の結果に見られる細胞の由来毎

の毒性の差異と照らし合わせることで、Sensitivity Index の妥当性がある程度検証できる。なお、本研究では一手法の提案として、各遺伝子間の相互作用や遺伝子毎の毒性感受性への寄与の差異を無視した簡易的なモデル式により各指標を計算しているため、こういった検証の過程では対象とする遺伝子群の選定やモデル式の構造についても多面的な検討を行い、より妥当な評価法を目指したい。

上述のように従来の毒性指標との比較を通じて個々の遺伝子変動パターンとの差異と細胞における感受性の差異との関連性を特定し得ると考えられる。そうした検討の後の将来的な見通しとして、本評価法には、放射線等係数のような *in vitro* 毒性試験主体のリスク評価への適用例が考えられる。本評価のヒト健康リスク評価への適用例を図 5-6 に示す。一般に、*in vitro* 毒性試験を中心としたリスク評価を行う場合、まず体内動態モデルを用いる等して *in vivo*、すなわち生体レベルでの曝露を *in vitro*、すなわち細胞レベルでの曝露に変換する。続いて *in vitro* 毒性試験を行い *in vitro* 用量反応関係を得て、評価した内部曝露量に対応する細胞レベルでの応答の程度を把握する。更に、*in vitro* での応答と *in vivo* での応答とをつなぐ何らかのモデル（発がんモデル）を参照し、最終的に *in vivo* での応答を定量評価するわけである。このような評価体系において、*in vitro* 毒性試験により *in vitro* 用量反応関係を把握する過程で Sensitivity Index の様な感受性指標を導入することで細胞レベルでの応答について個体差を組み込んだ評価を行うことができ、発がんモデルを参照することで結果的に生体レベルでの応答に対しても個体差を組み込んだ評価が行えると考えられる。

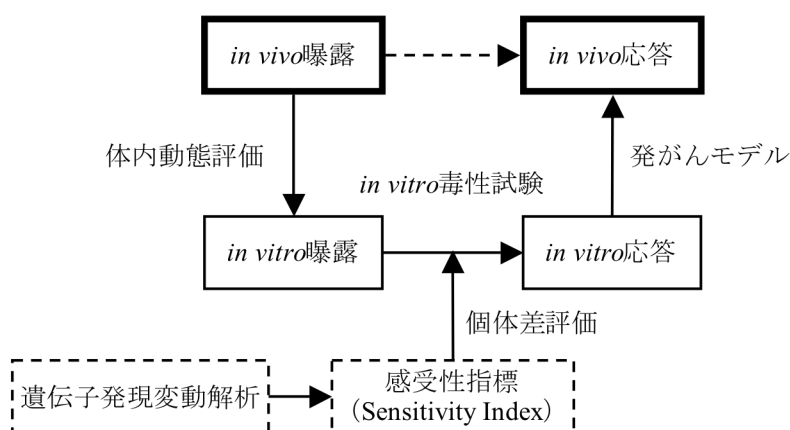


図 5-6 将来像としての、Sensitivity Index のリスク評価への適用例

このように将来的にはリスク評価への応用が期待される本手法であるが、既存の不確実係数に代わる新規指標とするには、組織レベルでの影響試験や実験動物を用いた発がん試験と比較する等、よりヒト生体レベルに近い感受性の差異との相関を示すことが必要不可欠であり、また、図 5-6 に示した適用例においても信頼性の高い発がんモデルの構築を待つ必要がある等、長期的な検証を要する。そこで、より早い段階での適用例として考えられるのが、図 5-7 に示す、いわばスクリーニング評価としての利用である。すなわち、現在不確実係数を用いた評価が行われている種々の化学物質を対象として本評価を適用することでそれぞれの物質に対する感受性の差異を見積もり、比較する。その結果から、際立って感受性指標の差異が大きいまたは小さい等で、既存の不確実係数を再設定して規制レベルを見直すべくより詳細な検討を行う優先度の高い物質を見出すことで、効率的な対策を取ることが可能となる。

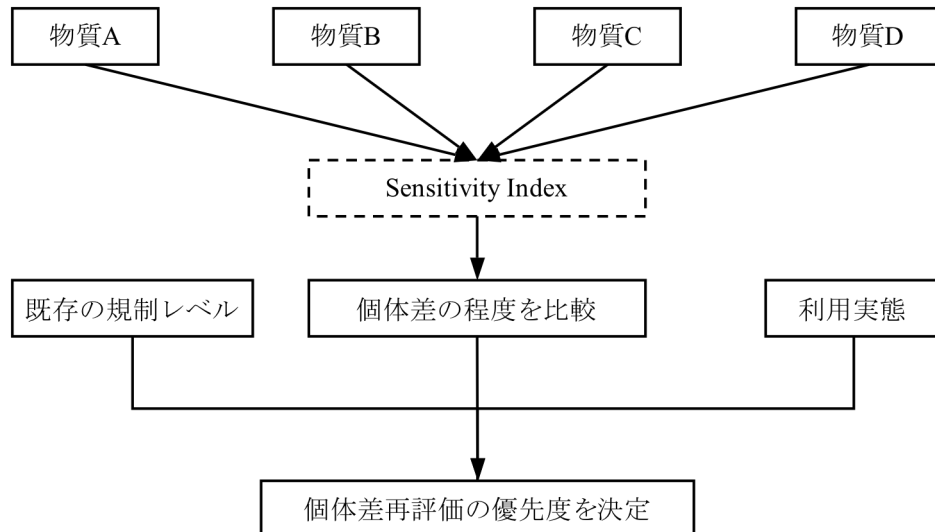


図 5-7 Sensitivity Index のスクリーニングとしての利用例

## 5-8 本章のまとめ

本章では、CAT あるいは  $\gamma$  線を曝露したヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup>細胞を対象として DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現変動解析を行い、その結果をリスク評価に適用する可能性について検討した。

まず、CAT 曝露細胞と  $\gamma$  線照射細胞とで遺伝子発現変動パターンを比較し、白血病リスク評価のバイオマーカーとなり得る遺伝子群を探索した。その結果、表 5-7 に示した 60 個の遺伝子では CAT 曝露と  $\gamma$  線照射の両者に共通して発現量が増加し、表 5-8 に示した 39 個の遺伝子では CAT 曝露と  $\gamma$  線照射の両者に共通して発現量が減少した。これら 99 の遺伝子の内、特に白血病発症と関連が深いと考えられる注目すべき遺伝子としては、BCL2, NUP98, CCNG1, CYP2B6 が挙げられる。中でも BCL2 を中心とした細胞増殖制御機構は、続いたパスウェイ解析においても CAT 曝露及び  $\gamma$  線照射との関連が示唆されており、白血病マーカーとしての有効性が期待され、今後の追加検証が望まれる。

また一方で、3 種類の異なるドナーに由来する CD34<sup>+</sup>細胞における CAT 曝露による遺伝子発現変動パターンを比較することで、CAT に対する生体応答の個人差について考察し、その差異を遺伝子発現変動の差異に基づいて定量的に表現する方法について検討した。本研究では Yoon らの提案するベンゼン誘発白血病メカニズム[5-4]を参考に、CAT 曝露に対する感受性指数として単純な仮定に基づいて Sensitivity Index を定義し、Asian, Black, Hispanic の 3 ドナーそれぞれの感受性の個人差の定量評価を試みた。その結果、Sensitivity Index の数値は、Asian 由来 CD34<sup>+</sup>細胞に比べて Black 由来 CD34<sup>+</sup>細胞で 2.26 倍、Hispanic 由来 CD34<sup>+</sup>細胞で 2.36 倍大きな値となり、既存の疫学情報と一致する傾向を示した[5-29]。本評価法自体の妥当性については今後も慎重に検証を重ねる必要があるが、本評価は、図 5-6, 5-7 に示したようなリスク評価への適用例も考えられる他、従来用いられてきた不確実係数を詳細な分子生物学的根拠に基づいた総合的な感受性指標として再設定する手法を提案する点で意義深く、今後のリスク評価のあり方に大きく資する可能性を有するものと考えられる。

## 参考文献

5-1. 北林一生(2000): AML1-MTG8 による白血病発症機構, 蛋白質 核酸 酵素, 45(1), 26-32.



- 5-2. Smith M.T.(2010): *Advances in understanding benzene health effects and susceptibility*, *Annual Review of Public Health*, 31, 133-48.
- 5-3. 高橋伸一郎(2005): *Flt3 変異による AML 細胞増殖の機序*, *血液・腫瘍科*, 50(2), 179-88.
- 5-4. Yoon B.I., Li G.X., Kitada K., Kawasaki Y., Igarashi K., Kodama Y., Inoue T., Kobayashi K., Kanno J., Kim D.Y., Inoue T. and Hirabayashi Y.(2003): *Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue*, *Environmental Health Perspectives*, 111(11), 1411-20.
- 5-5. Dorne J.L. and Renwick A.G.(2005): *The refinement of uncertainty/safety factors in risk assessment by the incorporation of data on toxicokinetic variability in humans*, *Toxicological Sciences*, 86(1), 20-6.
- 5-6. QIAGEN(2006): *In RNeasy® Mini Handbook*, 25-30.
- 5-7. Agilent Technologies(2009): *In One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling) Protocol v6.0*, 53-64.
- 5-8. Agilent Technologies(2009): *In One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling) Protocol v6.0*, 29-39.
- 5-9. Sammett D., Lee E.W., Kocsis J.J. and Snyder R.(1979): *Partial hepatectomy reduces both metabolism and toxicity of benzene*, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 5(5), 785-92.
- 5-10. Gut I., Nedelcheva V., Soucek P., Stopka P., Vodicka P., Gelboin H.V. and Ingelman-Sundberg M.(1996): *The role of CYP2E1 and 2B1 in metabolic activation of benzene derivatives*, *Archives of Toxicology*, 71(1-2), 45-56.
- 5-11. Kim S., Vermeulen R., Waidyanatha S., Johnson B.A., Lan Q., Smith M.T., Zhang L., Li G., Shen M., Yin S., Rothman N. and Rappaport S.M.(2006): *Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures*, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15(11), 2246-52.
- 5-12. Seaton M.J., Schlosser P., Bond J.A. and Medinsky M.A.(1994): *Benzene metabolism by human liver microsomes in relation to cytochrome P450 2E1 activity*, *Carcinogenesis*, 15(9), 1799-806.
- 5-13. Sheets P.L., Yost G.S. and Carlson G.P.(2004): *Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1*, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 18(2), 92-9.
- 5-14. Waidyanatha S., Rothman N., Li G., Smith M.T., Yin S. and Rappaport S.M.(2004): *Rapid determination of six urinary benzene metabolites in occupationally exposed and unexposed subjects*, *Analytical Biochemistry*, 327(2), 184-99.
- 5-15. Green D.R. and Reed J.C.(1998): *Mitochondria and apoptosis*, *Science*, 281(5381), 1309-12.
- 5-16. Nadel B., Marculescu R., Le T., Rudnicki M., Böcskő S. and Jäger U.(2001): *Novel insights into the mechanism of t(14;18)(q32;q21) translocation in follicular lymphoma*, *Leukemia & Lymphoma*, 42(6), 1181-94.
- 5-17. Schimmer A.D.(2007): *Novel therapies targeting the apoptosis pathway for the treatment of acute myeloid leukemia*, *Current Treatment Options in Oncology*, 8(4), 277-86.
- 5-18. Schimmer A.D. (2008): *Apoptosis in leukemia: from molecular pathways to targeted therapies*, *Best practice & research. Clinical Haematology*, 21(1), 5-11.
- 5-19. Shipley J.L. and Butera J.N.(2009): *Acute myelogenous leukemia*, *Experimental Hematology*, 37(6), 649-58.
- 5-20. Jaju R.J., Fidler C., Haas O.A., Strickson A.J., Watkins F., Clark K., Cross N.C., Cheng J.F., Aplan P.D., Kearney L., Boulwood J. and Wainscoat J.S.(2001): *A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia*, *Blood*, 98(4), 1264-7.

- 5-21. Borrow J., Shearman A.M., Stanton V.P. Jr., Becher R., Collins T., Williams A.J., Dubé I., Katz F., Kwong Y.L., Morris C., Ohyashiki K., Toyama K., Rowley J. and Housman D.E.(1996): *The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9*, *Nature Genetics*, 12(2), 159-67.
- 5-22. Rosati R., La Starza R., Veronese A., Aventin A., Schwienbacher C., Vallespi T., Negrini M., Martelli M.F. and Mecucci C.(2002): *NUP98 is fused to the NSD3 gene in acute myeloid leukemia associated with t(8;11)(p11.2;p15)*, *Blood*, 99(10), 3857-60.
- 5-23. Reader J.C., Meekins J.S., Gojo I. and Ning Y.(2007): *A novel NUP98-PHF23 fusion resulting from a cryptic translocation t(11;17)(p15;p13) in acute myeloid leukemia*, *Leukemia*, 21(4), 842-4.
- 5-24. Ahuja H.G., Felix C.A. and Aplan P.D.(1999): *The t(11;20)(p15;q11) chromosomal translocation associated with therapy-related myelodysplastic syndrome results in an NUP98-TOPI fusion*, *Blood*, 94(9), 3258-61.
- 5-25. Chen H.Y., Lin D.H., Luo L.Q. and Hu J.D.(2009): *Expression of P27(kip1) and cyclin G in patients with acute leukemia and its correlation*, *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 17(4), 847-51.
- 5-26. Berköz M. and Yalin S.(2004): *Association of CYP2B6 G15631T polymorphism with acute leukemia susceptibility*, *Leukemia Research*, 33(7), 919-23.
- 5-27. Yuan Z.H., Liu Q., Zhang Y., Liu H.X., Zhao J. and Zhu P.(2010): *CYP2B6 gene single nucleotide polymorphisms and leukemia susceptibility*, *Annals of Hematology*.
- 5-28. 吉田喜久雄, 中西準子(2006): 環境リスク解析入門[化学物質編], 東京図書.
- 5-29. Parkin D.M., Whelan S.L., Ferlay J., Raymond L. and Young J.(1997): *Cancer Incidence in Five Continents: Volume VII, IARC Scientific Publications No.143*.

## Chapter 6 二次元電気泳動を用いたタンパク発現変動解析

### 6-1 本章の目的

Chapter 3 及び Chapter 5 で解析対象とした染色体異常や遺伝子変動といった遺伝子レベルでの変異は発がんの根源事象として非常に重要である。その一方で、生体内での作用を考えるにあたって、タンパク質は DNA や RNA よりも下流側、つまり生体作用に近い位置にあり、発がんの本質は変異した遺伝子から産生される異常タンパク質が正常な機能を持たないことにありと考えられる。すなわち、タンパク質の発現変動は、遺伝子レベルでの変異と比べて、より直接的に生体作用に反映されると言える。また、放射線発がんの一次標的が DNA そのものではなくタンパク質である可能性を示唆する研究成果も発表されている[6-1~6-3]。従って、タンパク質の発現変動は *in vitro* 試験に基づいて *in vivo* の用量反応関係を予測する良好なバイオマーカーとなり得ると考えられる。

以上を踏まえて、本章では、X 線、及びベンゼン代謝物として CAT, HQ を曝露したヒト骨髓由来 CD34<sup>+</sup>細胞からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動による網羅的発現変動解析を行った。その結果を比較して X 線及びベンゼン代謝物の曝露に共通して特異的に発現量を変動させるタンパク質を検出し、X 線及びベンゼン誘発白血病のマーカータンパク質の候補を探索することを目的とした。また、得られた特異タンパク候補群の情報を Chapter 5 で得た特異遺伝子候補群の情報と比較することで、得られた特異タンパク候補群の有用性について検討した。

### 6-2 タンパク質と白血病

タンパク質は、白血病をはじめとする種々のがんの発症と密接に関連している。白血病において病型特異的な染色体異常が次々と明らかにされる中、遺伝子レベルでの変異は発がんの第一段階として非常に重要であるが、発がんの本質は変異を持った遺伝子から構造や配列に異常を有するタンパク質が産生され、そのタンパク質が本来の機能を十分に発揮しないことにある。

例えば、8 番染色体と 21 番染色体との間で起きる t (8;21)転座は急性骨髄性白血病に高頻度に見られる染色体異常の一つであるが、この転座においては 21 番染色体上に位置する AML1 遺伝子と 8 番染色体上に位置する MTG8 遺伝子とが融合し、AML1/MTG8 キメラ遺伝子が形成される。この AML1/MTG8 キメラ遺伝子が産生する融合タンパク質は、骨髄性細胞の成熟好中球への分化を阻害することで白血病の発症に関与しているとされている。その他、白血病特異的な染色体転座として t (3;21)や t (12;21)、t (15;17)等が挙げられ、これらの転座においてもそれぞれ対応する融合タンパク質が産生され、白血病の発症に寄与するとされる。また、ベンゼン誘発白血病や抗癌剤投与による治療関連白血病等では、DNA 鎖の切断及び再結合に関わる酵素であるトポイソメラーゼ II の機能阻害と発症との密接な関連が示唆されている[6-4]。

他に、白血病のみならず様々ながんに関連する重要な機能を有するタンパク質として、「がん抑制遺伝子」としてよく知られる p53 がある。p53 は、p21 や GADD45 等の細胞周期調節因子に作用すると共に、Bcl-2, Bax 等のアポトーシス関連因子を活性化し、種々のストレス要因に対する防御機構の中心を担っている。このタンパク質の機能に異常が生じることで、ストレス要因によりもたらされた遺伝子の異常が十分に除去あるいは修復されず、異常細胞が増殖を続けて悪影響が顕在化するとされる。ベンゼン誘発白血病においても、p53 を中心とした一連の防御機構に生じた異常がその毒性発現に寄与することが示唆されている[6-5]。

以上のように、実に様々なタンパク質が発がんとの密接な関係を有しており、解析技術の進歩も相まって、近年ではがんにおけるタンパク質発現プロファイルの解析が盛んに進められ、診断や治療に利用されている[6-6]。

### 6-3 二次元電気泳動

二次元電気泳動は二段階のゲル電気泳動により試料中のタンパク質を二次元に分離する手法であり、タンパク質分析の分野で広く用いられている。二次元電気泳動では一般に、一次元目は等電点電気泳動を用いてタンパク質を等電点により分離し、二次元目は SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を用いて分子量により分離する。いずれの手法も分離能が高く、試料中のタンパク質を個々の定量可能な多数のスポットとして検出できる。試験群と対照群それぞれの試料から抽出したタンパク質の泳動画像は、それぞれに固有なタンパクプロファイルと考えることができ、これらを比較することで、特異的に発現量を変化させるタンパク質の候補を探索することができるわけである。

タンパク質は、アミノ酸側鎖やアミノ末端、カルボキシル末端など構造によって様々な電荷を帯びている。その電荷は pH 条件によって変化するが、電荷の総和がゼロとなるような pH 値を等電点 (isoelectric point, pI) という。pH 勾配を持った泳動ゲルに試料タンパクを添加して電場をかけると、試料中のタンパク質は固有の等電点と同じ pH 値に相当する位置までゲル中を移動する。この現象を利用してタンパク質を等電点により分離、分析するのが等電点電気泳動である。等電点電気泳動としては近年では、分離能、再現性、添加許容量共に優れる固定化 pH 勾配 (immobilized pH gradient, IPG) 法が主に用いられている。IPG 法は、様々な等電点の側鎖を持つアクリルアミド誘導体を用いてゲル作製と同時に pH 勾配を形成する手法である。

等電点電気泳動の後に行う SDS-PAGE ではまず、陰イオン性界面活性剤である SDS をタンパク質に結合させる。この処理によりタンパク質と結合する SDS の量はほぼタンパク質の大きさによって決まり、タンパク質分子は SDS 結合量に依存した電荷を持つ。その上で  $\beta$ -メルカプトエタノールや DTT (dithiothreitol) などの還元剤を添加してタンパク質のジスルフィド結合を切断し、一本鎖のポリペプチド状態にして電場をかける。その結果、ポリアクリルアミドゲルの分子ふるい効果により、ポリペプチド鎖が長い分子、すなわち分子量が大きい分子ほど移動度が小さくなり、反対に分子量が小さい分子は移動度が大きくなるため、タンパク質を分子量に従って分離することができる。

以上のような 2 段階の手順を経て試料中のタンパク質を個々のスポットとして検出して解析するのが二次元電気泳動の概要である[6-7]。

### 6-4 実験方法

#### 6-4-1 試薬及び細胞

試薬は特に記載の無い限りは和光純薬（大阪）製の生化学用または試薬特級を用いた。

使用した細胞は Lonza (Switzerland) より購入した Bone Marrow CD34<sup>+</sup> cells であり、そのドナー情報は 26 歳 Hispanic 女性である。解凍した細胞を Chapter 2 で決定した最適培養条件に従って 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 湿度 100% の条件下で 6 日間培養し、細胞が対数増殖期にあることを確認した。

#### 6-4-2 曝露処理

ベンゼン代謝物曝露サンプルでは、6 日間の培養の後細胞を回収し、培養液の半量を新しい培養液と交換して細胞密度  $5.0 \times 10^4$  cells/mL にて播種し直した。そこへ最終濃度が所定の濃度となるように調製した被験物質の水溶液を培養液の 1% 量 (v/v) 加え、30 時間の曝露処理を行った。曝露処理濃度は、非曝露、CAT6 $\mu$ M, HQ6 $\mu$ M, CAT2 $\mu$ M+HQ4 $\mu$ M (計 6 $\mu$ M) の 4 条件とした。複合曝露 (CAT+HQ) では、Chapter 3-3-2 と同様に、ベンゼンの職業曝露による CAT と HQ の尿中濃度の測定値[6-8]に基づき、CAT と HQ の濃度比を 1 : 2 とした。

放射線照射サンプルでは、6 日間の培養の後細胞を回収し、細胞密度  $1.0 \times 10^5$  cells/mL にて播種し直した。放射線の照射には X 線照射装置 Radioflex 350 (Rigaku, 東京) (5Gy/min, 250kV, 15mA, Al 2mm filter) を用いた。照射線量は、0Gy、0.5Gy、1.0Gy、1.5Gy の 4 条件とした。照射後の細胞は同じ培養液中で 30 時間の回復培養を行い、ベンゼン代謝物と同様 30 時間の処理時間とした。

#### 6-4-3 タンパク質の抽出及び精製

30 時間の処理後、回収した細胞塊に 100 $\mu$ L の cellular lysis solution (8M 尿素、4% CHAPS (GE healthcare bioscience, UK), 40mM Tris) を加え、超音波破碎装置 SONIFIER 150 (BRANSON, CT) を用いて細胞膜を破壊することで細胞からタンパク質を抽出した。なお、超音波破碎は 4 W にて 20 秒間行い、その後細胞懸濁液を 30 秒間氷上に静置するという操作を 5 回繰り返した。

得られたタンパク質抽出液は、塩類や糖等の夾雑物の除去のため、2-D Clean Up Kit (GE healthcare bioscience) を用いて精製を行った。精製後、2-D Quant Kit (GE healthcare bioscience) を用いてタンパク質を定量した。なお、単位細胞数あたりの抽出タンパク質量の変動係数は 15%未満であった (1 条件につき  $n = 5$ )。

#### 6-4-4 二次元電気泳動

一次元目の電気泳動 (等電点電気泳動) に用いたゲルは、GE healthcare bioscience 製の Immobiline DryStrip (pH4-7, 24cm) である。まず、6-4-3 で得た精製後のタンパク質抽出液からタンパク質 50 $\mu$ g に相当する液量を取り、rehydration solution を加えて全量を 450 $\mu$ L とした。この rehydration solution は、8M 尿素、4% CHAPS、40mM Tris, 0.28% DTT (GE healthcare bioscience), 0.5% IPG buffer (GE healthcare bioscience) を混合して作製した。続いて、タンパク質溶液と共に Immobiline DryStrip Reswelling Tray (GE healthcare bioscience) 上に室温、16 時間のストリップの膨潤を行った。なお、乾燥を防ぐために DryStrip cover fluid (GE healthcare bioscience) を重層した。膨潤終了後、Ettan IPGphor 3 (GE healthcare bioscience) を用いて室温にて等電点電気泳動を行った。泳動条件は表 6-1 に示す通りである。

泳動終了後のストリップは、二次元目の電気泳動の直前に 2 段階の平衡化を行った。まず、1 段階目の平衡化には 50mM Tris-HCl, 6M 尿素、30% グリセロール、2% SDS, 0.002% Bromophenol blue (MP biomedical, OH) からなる equilibration solution に 1% DTT を添加して用い、MULTI SHAKER MMS (EYELA, 東京) 上で穏やかに 15 分間振とうした。次に、2 段階目の平衡化には同様の equilibration solution に 2.5% ヨードアセトアミドを添加して用い、MULTI SHAKER MMS 上で穏やかに 15 分間振とうした。以上の平衡化プロセスにおいては、DTT がタンパク中のジスルフィド結合を切断して立体構造をとき、露出したシステイン残基をヨードアセトアミドによって保護することで一次構造を維持する。

表 6-1 等電点電気泳動条件

STEP	条件	電圧	時間	電圧 $\times$ 時間
1	Step and Hold	100V	1hr	100Vhrs
2	Step and Hold	500V	1hr	500Vhrs
3	Gradient	1000V	7hr	5200Vhrs
4	Gradient	8000V	3hr	13500Vhrs
5	Step and Hold	8000V	3.45hr	27600Vhrs

二次元目の電気泳動である SDS-PAGE には泳動装置として Ettan Dalt six (GE healthcare bioscience) を用いた。装置の上部 buffer chamber には 50mM Tris, 384mM グリシン (MP biomedical), 0.2% SDS からなる running buffer I を満たし、下部 buffer chamber には 25mM Tris, 192mM グリシン、0.1% SDS からなる running buffer II を満たした。泳動用のゲルには 255mm×205mm×1mm の 12.5%ゲルを作成して用いた。なお、12.5%ゲルは、25% 40% アクリルアミド・ビス混合液 (nacalai tesque, 京都)、375mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 0.05% ammonium persulphate (nacalai tesque), 0.33μL/mL TEMED (nacalai tesque) を混合して作製した。このゲルの上に平衡化したストリップを密着させ、封入用アガロース溶液で封入し、SDS-PAGE を行った。封入用アガロース溶液は、running buffer II を溶媒とする 0.5% アガロース、0.002% bromophenol blue 溶液である。泳動はゲル 1 枚につき、まず 2.5W で 30 分間、次いで 25W で bromophenol blue の層がゲルの下端近くに到達するまで行った。なお、温度の維持には恒温循環装置 NCB-2500 (EYELA) を使い、泳動中のゲル及び泳動用溶液の温度を 10℃に保った。泳動終了後のゲルは 2D-銀染色試薬 II (第一化学) を用いた銀染色により染色した。

#### 6-4-5 特異タンパク質の同定

染色されたゲルは GT-X 8000 (SEIKO EPSON Corporation, 東京) を用いて TIFF ファイルとして取り込み、解析ソフト PDQuest (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いて泳動パターンの解析を行った。なお、最終的に解析対象とした画像は、ピクセルサイズ 160μm の 8bit モノクロ TIFF ファイルである。ベンゼン代謝物曝露サンプルで 12 枚 (非曝露、CAT 曝露、HQ 曝露、CAT+HQ 複合曝露の 4 条件それぞれにつき 3 枚ずつ)、放射線照射サンプルで 10 枚 (0Gy, 1.5Gy で 3 枚ずつ、0.5Gy, 1.0Gy で 2 枚ずつ)、合計 22 枚の良好な泳動像を選択してソフトウェアに取り込み、スポット検出を行った。検出されたスポットの内、肉眼にて単独のスポットとして識別可能なもののみを選択して解析対象とし、汚れや泳動縞によると考えられるものは解析対象から除外した。これらのスポットの全てに関してマッチング、すなわちゲル間での対応付けを行った後、バックグラウンドの除去とスポット濃度の正規化を行った。なお、解析対象としたスポット数はベンゼン代謝物曝露サンプルで 1 ゲルあたり 692 スポット、放射線照射サンプルで 1 ゲルあたり 412 スポットであり、スポット濃度の正規化には LOESS 法による局所回帰モデルを用いた。各曝露条件のゲル 2 枚あるいは 3 枚における正規化後のスポット濃度の平均値をその曝露条件におけるタンパク発現量とし、ベンゼン代謝物曝露サンプルと非曝露サンプル、あるいは X 線照射サンプルと X 線非照射サンプルとの間でタンパク発現量に 2 倍以上の差が確認されたスポットを特異タンパク質として抽出した。

得られた特異タンパク質候補の同定は、Jensen らの方法[6-9]に基づいた質量分析によって行った。すなわち、銀染色後のゲルからそれぞれのスポット部位を切り出し、トリプシン (Promega Corporation, WI) によるゲル内消化として、50mM 炭酸アンモニウム及び 2%アセトニトリルを含む緩衝液中で 37℃にてオーバーナイト処理を行った。ペプチド断片の質量分析は MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry) 法によって行い、質量分析装置として ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, MA) を用いた。MALDI-TOF/MS により決定した分子量と NCBInr データベース (<http://www.protein.sdu.dk/gpmaw/GPMAW/Databases/NCBInr/ncbinr.html>) に登録されたペプチド質量の理論値とを比較することでタンパク質を同定した。

### 6-5 結果

#### 6-5-1 サンプル間の類似性の検討

発現変動解析に先立ち、実験の再現性を確認するために、正規化後のスポット濃度を用いて各ゲル間での発現量分布の相関係数を計算した。ベンゼン曝露サンプルを用いた泳動ゲル間での相関係数を表 6-2 に、X 線照

射サンプルを用いた泳動ゲル間での相関係数を表 6-3 に示す。なお、表 6-2 中では、ベンゼン代謝物非曝露サンプルの泳動ゲルを CON1-3 と表し、同様に CAT 曝露、HQ 曝露、CAT+HQ 複合曝露サンプルの泳動ゲルをそれぞれ CAT1-3, HQ1-3, MIX1-3 と表した。また、表 6-3 中では、非照射サンプルの泳動ゲルを 0Gy1-3 と表し、以下同様に 0.5Gy 照射、1.0Gy 照射、1.5Gy 照射サンプルの泳動ゲルをそれぞれ 0.5Gy1-2, 1.0Gy1-2, 1.5Gy1-3 と表した。電気泳動に用いたタンパク質量は全てのゲルで 1 ゲルあたり 50 $\mu$ g と等しく、また、大多数のタンパク質は曝露または照射によってもその発現量が変動しないと考えられるので、ゲル間の相関係数は高い値となることが期待される。ここで、二次元電気泳動の再現性に関しては、苗代らが、同一のヒト血漿に由来するリボソーム結合タンパク質を対象とした二次元電気泳動の結果から良好な再現性を示すスポット強度の相関係数として 0.7 以上を示している[6-10]。表 6-2 及び表 6-3 に示した通り、相関係数の計算値は 0.695-0.935 とほぼ 0.7 以上の値を取っており、実験の再現性に大きな問題は無いと判断した。

表 6-2 ベンゼン代謝物曝露サンプルの泳動ゲル間での相関係数

gel <sup>a</sup>	CON1	CON2	CON3	CAT1	CAT2	CAT3	HQ1	HQ2	HQ3	MIX1	MIX2	MIX3
CON1		0.796	0.799	0.743	0.802	0.729	0.781	0.704	0.695	0.834	0.815	0.768
CON2			0.874	0.780	0.878	0.826	0.813	0.807	0.789	0.867	0.857	0.855
CON3				0.846	0.883	0.848	0.830	0.841	0.804	0.868	0.851	0.912
CAT1					0.802	0.784	0.747	0.783	0.754	0.775	0.749	0.829
CAT2						0.847	0.829	0.821	0.788	0.877	0.861	0.858
CAT3							0.792	0.855	0.770	0.831	0.798	0.829
HQ1								0.764	0.776	0.851	0.836	0.824
HQ2									0.808	0.779	0.758	0.825
HQ3										0.777	0.763	0.797
MIX1											0.907	0.857
MIX2												0.839
MIX3												

<sup>a</sup>CON1-3は非曝露、CAT1-3はCAT, HQ1-3はHQ, MIX1-3はCAT+HQの各曝露サンプルの泳動ゲルを示す

表 6-3 X 線照射サンプルの泳動ゲル間での相関係数

gel <sup>a</sup>	0Gy1	0Gy2	0Gy3	0.5Gy1	0.5Gy2	1.0Gy1	1.0Gy2	1.5Gy1	1.5Gy2	1.5Gy3
0Gy1		0.796	0.791	0.790	0.855	0.756	0.882	0.862	0.886	0.836
0Gy2			0.870	0.813	0.777	0.791	0.821	0.789	0.816	0.829
0Gy3				0.834	0.776	0.821	0.820	0.788	0.821	0.760
0.5Gy1					0.779	0.911	0.790	0.817	0.817	0.744
0.5Gy2						0.796	0.880	0.868	0.901	0.840
1.0Gy1							0.790	0.766	0.813	0.741
1.0Gy2								0.881	0.930	0.875
1.5Gy1									0.905	0.860
1.5Gy2										0.889
1.5Gy3										

<sup>a</sup>0Gy1-3は非照射、0.5Gy1-2, 1.0Gy1-2, 1.5Gy1-3は各線量照射サンプルの泳動ゲルを示す

### 6-5-2 発現変動解析

得られたゲル画像の代表例として、CON3 のゲル画像を図 6-1 に、1.5Gy2 のゲル画像を図 6-2 に示す。また、発現変動解析の結果得られた特異スポットの情報とその同定結果の一覧を表 6-4 に示す。なお、図 6-1 及び図 6-2 には、検出した特異スポットを白色の四角で囲み、表 6-4 に示した識別番号と共に記した。発現変動解析

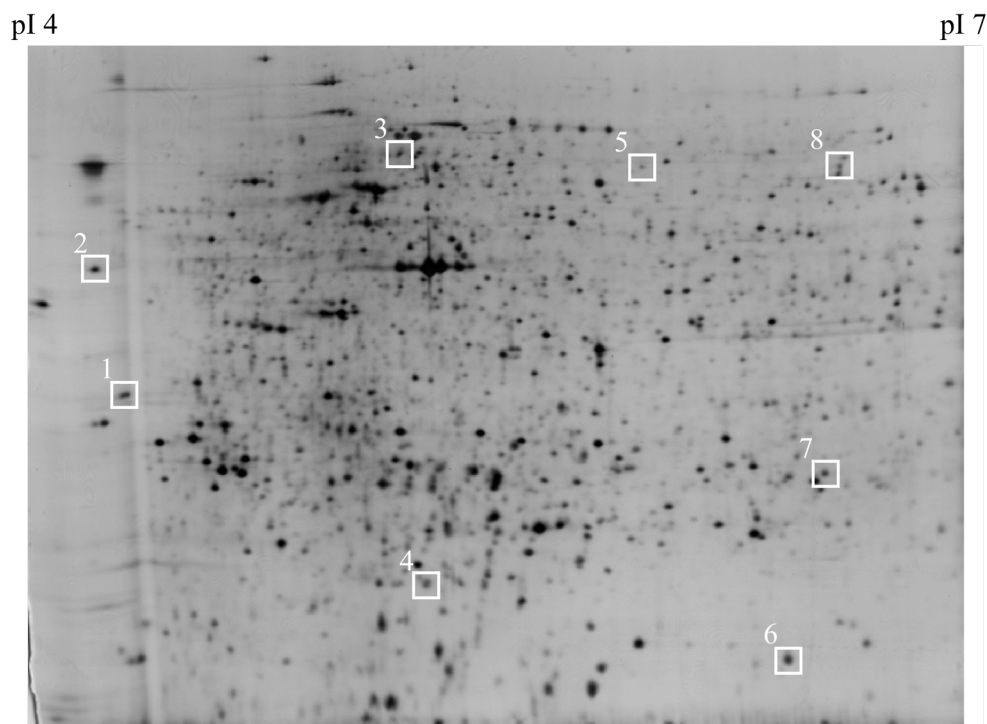


図 6-1 ベンゼン代謝物曝露サンプルにおける代表的ゲル画像 (CON3)

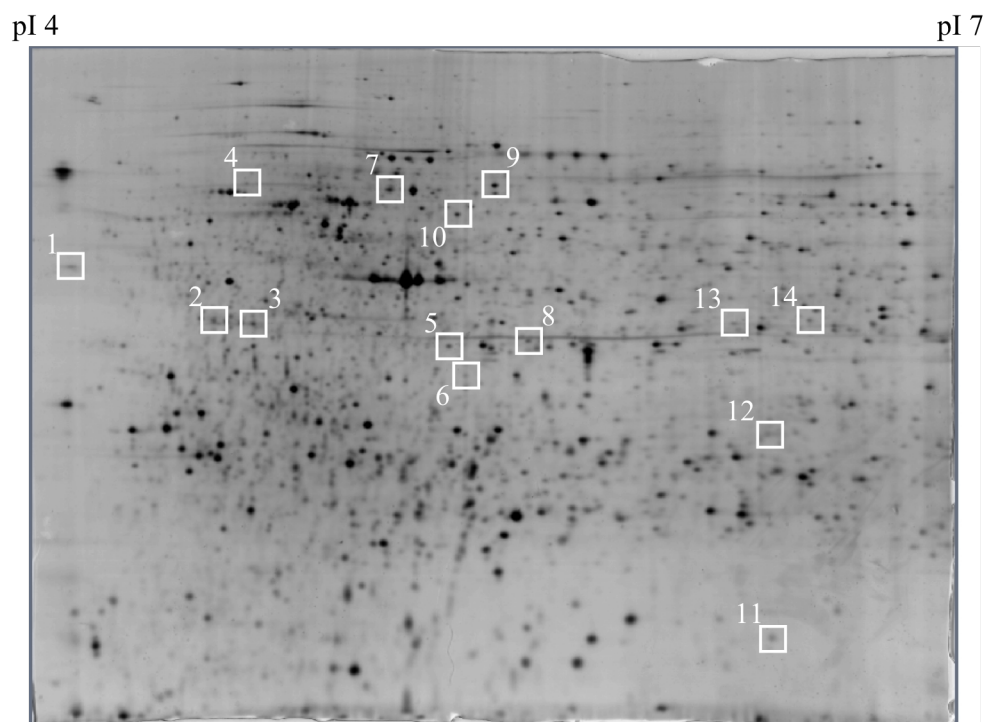


図 6-2 X 線照射サンプルにおける代表的ゲル画像 (1.5Gy2)



の結果、ベンゼン代謝物の曝露により特異的に発現量が変化したスポットが8スポット、X線の照射により特異的に発現量が変化したスポットが14スポット検出された。また、それらの内 Protein SET 及び Cofilin-1 の2種類のタンパク質はベンゼン代謝物曝露とX線照射の両者に共通して発現量が変化した。Protein SET の発現量はHQ曝露及びX線照射で共通して減少しており、Cofilin-1 の発現量はCAT曝露及びX線照射で共通して減少した。

表 6-4 発現変動解析及び特異スポット同定結果

Spot in Fig 7-1	Spot in Fig 7-2	MW		Protein	ratio of expression level							
		[kDa]	pI		CON	CAT	HQ	MIX	0Gy	0.5Gy	1.0Gy	1.5Gy
1	-	31.8	4.1	Clathrin, light polypeptide A	1	0.50	0.55	0.75	1	not specific		
2	1	44.1	4.0	Protein SET	1	0.71	0.38 <sup>c</sup>	0.80	1	0.47	0.46	0.44
3	-	61.7	5.0	Keratin-9	1	3.06	2.42	1.50	1	not specific		
4	-	21.4	5.1	Chromobox homolog 3	1	0.79	0.23 <sup>b</sup>	0.81	1	not specific		
5	-	60.1	5.8	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	1	1.84	4.47	1.43	1	not specific		
6	11	18.5	6.4	Cofilin-1	1	0.51	0.85	1.62	1	1.21	0.93	0.32
7	-	27.2	6.5	Proteasome subunit alpha type-6	1	1.71	2.58 <sup>c</sup>	1.38	1	not specific		
8	-	61.5	6.5	T-complex protein 1 subunit zeta	1	1.81	2.58 <sup>a</sup>	0.98	1	not specific		
-	2	40.2	4.5	Isoform 1 of Protein SET	1	not specific			1	0.49	0.70	0.52
-	3	39.6	4.6	40s ribosomal protein SA	1	not specific			1	0.99	0.70	0.54
-	4	63.9	4.7	not identified	1	not specific			1	0.48	0.56	0.49
-	5	35.9	5.3	highly similar to Actin, cytoplasmic 1	1	not specific			1	0.60	0.55	0.55
-	6	33.7	5.4	not identified	1	not specific			1	0.36	0.30	0.43
-	7	62.9	5.1	not identified	1	not specific			1	0.73	0.34 <sup>d</sup>	0.69
-	8	36.5	5.6	CAPZA2 20kDa protein	1	not specific			1	0.56	0.50	0.32 <sup>c</sup>
-	9	61.5	5.4	not identified	1	not specific			1	1.08	0.89	0.38
-	10	53.6	5.4	not identified	1	not specific			1	1.37	2.04	4.08 <sup>a</sup>
-	12	28.5	6.4	not identified	1	not specific			1	0.33	0.72	0.44
-	13	37.1	6.2	COP9 signalosome subunit 5 variant	1	not specific			1	0.43	0.36	0.65
-	14	36.7	6.5	not identified	1	not specific			1	0.69	0.72	0.67

\*MW, pIはそれぞれ分子量及び等電点の推算値を示す

\*\*"not identified"はスポット中のタンパク質量が少なく、有効な同定結果が得られなかったことを示す

\*\*\* a-dは非曝露群あるいは非照射群と比較した時の発現量の差異の有意性を示す

(aはP<0.01を、bはP<0.02を、cはP<0.05を、dはP<0.1を示す)

## 6-6 考察

本章では、X線、及びベンゼン代謝物としてCAT、HQを曝露したヒト骨髄由来CD34<sup>+</sup>細胞からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動による網羅的発現変動解析を行った。その結果、ベンゼン代謝物曝露に特異的なタンパク質を8個、X線照射に特異的なタンパク質を14個検出した。中でも、Protein SET 及び Cofilin-1 の2個のタンパク質はベンゼン代謝物曝露とX線照射の両者に共通して発現量を変化させた。Protein SET の発現量はHQ曝露及びX線照射で共通して減少し、Cofilin-1 の発現量はCAT曝露及びX線照射で共通して減少した。

Protein SET は様々な機能を有するタンパク質として知られ、アポトーシスや転写、ヌクレオソームアセンブリーやヒストン結合等、生体内の種々の現象に関わる。また SET は、ウイルスコアタンパク質と結合して複合体を形成したアデノウイルスゲノムの DNA 修復刺激因子としても作用する。SET は白血病関連タンパク質としても知られており、急性未分化白血病において相互転座 t (9;9) に起因する融合タンパク質 SET-CAN の形成が報告されている[6-11~6-14]。更に、SET はタンパク質ホスファターゼ 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) の阻害剤としても作用し、その核局在性やタンパク質間相互作用、PP2A 阻害活性等が白血病発症において中心的な役割を担うと考えられている[6-15]。PP2A はセリン/トレオニンホスファターゼの 1 種であり、PP2A が活性化されることで JNK (c-Jun N-terminal kinase) 活性を抑制し、アポトーシスによる細胞死の制御に重要な役割を果たすとされる[6-16]。また、PP2A は、p53 が転写を調節する標的の 1 つであり細胞周期の調節に関わる cyclin G の機能に関与するとともにされている[6-17]。すなわち、本章で検出した SET の発現量低下は PP2A の過剰発現によりアポトーシス等の細胞周期調節機能に何らかの異常が生じている可能性を示唆していると言える。更に SET は、JNK と同じく分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ MAPK (mitogen-activated protein kinase) ファミリーとして知られる ERK の活性を阻害することが報告されており、外的刺激によって活性化された MEK/ERK パスウェイを阻害して G1/S 遷移を抑制することで異常細胞の増殖を抑える、「がん抑制遺伝子」としての機能が示唆されている[6-18]。従って、ベンゼン代謝物曝露と X 線照射とに共通して SET の発現量が低下したことは、SET-PP2A-JNK パスウェイによる骨髓細胞における細胞周期・増殖調節機能がベンゼン誘発白血病と放射線誘発白血病の両者の発症において共通の重要な役割を持つ可能性が考えられる。

一方 Cofilin-1 は、p18 (18kD phosphoprotein) と呼ばれ、アクチン重合及び脱重合を可逆的に制御する。良性前立腺過形成細胞 BPH (benign prostatic hyperplasia cells) においては、LIMK1 (LIM kinase 1) が Cofilin のリン酸化を不活性化し、その結果染色体異常を誘発すると報告されており、前立腺における発がん性が示唆されている[6-19~6-22]。白血病と直接的に関連する研究例は報告されていないが、LIMK1 が JNK 活性を阻害する報告例[6-23]もあり、Cofilin-1 の発現量の低下が SET-PP2A-JNK パスウェイと関連する可能性も考えられる。

その他に注目すべきタンパク質としてここでは、HQ 曝露により発現量が上昇した Serine/threonine-protein kinase PAK2 と、X 線照射により発現量が低下した COP9 signalosome subunit 5 (COPS5) とを取り上げる。PAK2 は、リボソームタンパク質 S6、ヒストン H4、ミエリン塩基性タンパク質等、様々なタンパク質を標的とする活性化キナーゼで、細胞生存及び増殖を刺激することが知られている。この過程は、少なくとも部分的には、アポトーシス促進因子である Bax のリン酸化により媒介され、カスパーゼ活性化 PAK2 は JNK シグナル伝達経路と関連する形で細胞死応答に関わるとされている[6-24~6-27]。一方、COPS5 は、COP9 シグナロソーム (COP9 signalosome, CSN) 複合体のサブユニットの 1 つであり、種々の細胞発達過程と関連する。CSN 複合体は、SCF 型 E3 リガーゼ複合体のカリンサブユニットの deneddylation を媒介し、SCF や CSA, あるいは DDB2 等の SCF 型複合体のユビキチンリガーゼ活性を減少させることでユビキチン抱合経路を調節する。CSN 複合体はまた、p53 や c-Jun のリン酸化にも関与しており、JNK シグナル伝達経路との関連が示唆される[6-28~6-33]。

以上の様に、本章で検出した特異タンパク質群の発現変動は、SET-PP2A-JNK パスウェイがベンゼン誘発白血病及び放射線誘発白血病の発症に共通して関連する可能性を示しており、SET をはじめ、関連遺伝子及びタンパク質の白血病リスク評価におけるマーカー候補としての有用性が示唆される。

また、この結果を Chapter 5 で示したマイクロアレイによる白血病マーカー候補遺伝子群の探索結果と比較するに、本章で検出した特異タンパク質群を直接コードする遺伝子の発現変動は検出されなかったが、5-7-1 で取り上げた BCL2 については PP2A との関連が報告されており、また、cyclin G すなわち CCNG1 も PP2A

と関与する可能性が高い[6-17,34,35]。従って、遺伝子変動の観点からも SET-PP2A-JNK パスウェイに関連する機構がベンゼン及び放射線誘発白血病の発症において重要な役割を果たす可能性は高く、ウェスタンブロット法によるタンパク質定量試験を行う等、今後の追加検討が強く望まれる。

#### 参考文献

- 6-1. Kumagai J., Masui K., Itagaki Y., Shiotani M., Kodama S., Watanabe M. and Miyazaki T.(2003): *Long-lived mutagenic radicals induced in mammalian cells by ionizing radiation are mainly localized to proteins*, *Radiation Research*, 160(1), 95-102.
- 6-2. Suzuki M., Suzuki K., Kodama S. and Watanabe M.(2006): *Interstitial chromatin alteration causes persistent p53 activation involved in the radiation-induced senescence-like growth arrest*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), 145-50.
- 6-3. Urushibara A., Kodama S., Suzuki K., Desa M.B., Suzuki F., Tsutsui T. and Watanabe M.(2004): *Involvement of telomere dysfunction in the induction of genomic instability by radiation in scid mouse cells*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 1037-43.
- 6-4. Smith M.T.(2010): *Advances in understanding benzene health effects and susceptibility*, *Annual Review of Public Health*, 31, 133-48.
- 6-5. Yoon B.I., Li G.X., Kitada K., Kawasaki Y., Igarashi K., Kodama Y., Inoue T., Kobayashi K., Kanno J., Kim D.Y., Inoue T. and Hirabayashi Y.(2003): *Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue*, *Environmental Health Perspectives*, 111(11), 1411-20.
- 6-6. Honda T., Tamura G., Endoh Y., Nishizuka S., Kawata S. and Motoyama T.(2005): *Expression of tumor suppressor and tumor-related proteins in differentiated carcinoma, undifferentiated carcinoma with tubular component and pure undifferentiated carcinoma of the stomach*, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 35(10), 580-6.
- 6-7. 竹縄忠臣(2004): タンパク質実験ハンドブック, 羊土社
- 6-8. Rothman N., Bechtold W.E., Yin S.N., Dosemeci M., Li G.L., Wang Y.Z., Griffith W.C., Smith M.T. and Hayes R.B.(1998): *Urinary excretion of phenol, catechol, hydroquinone, and muconic acid by workers occupationally exposed to benzene*, *Occupational and Environmental Medicine*, 55(10), 705-11.
- 6-9. Jensen O.N., Podtelejnikov A. and Mann M.(1996): *Delayed extraction improves specificity in database searches by matrix-assisted laser desorption/ionization peptide maps*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(11), 1371-8.
- 6-10. 苗代康可, 相馬仁, 小海康夫(2002): リボソームをバイオリガンドとした RA 血清早期診断法, [http://www.allergy.go.jp/Research/Shouroku\\_07/08\\_naishiro.html](http://www.allergy.go.jp/Research/Shouroku_07/08_naishiro.html) (Accessed Dec 17th, 2010).
- 6-11. Adachi Y., Pavlakis G.N. and Copeland T.D.(1994): *Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia*, *The Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 2258-62.
- 6-12. Nagata K., Kawase H., Handa H., Yano K., Yamasaki M., Ishimi Y., Okuda A., Kikuchi A. and Matsumoto K.(1995): *Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4279-83.

- 6-13. Tsujio I., Zaidi T., Xu J., Kotula L., Grundke-Iqbal I. and Iqbal K.(2005): *Inhibitors of protein phosphatase-2A from human brain structures, immunocytochemical localization and activities towards dephosphorylation of the Alzheimer type hyperphosphorylated tau*, *FEBS Letters*, 579(2), 363-72.
- 6-14. von Lindern M., van Baal S., Wiegant J., Raap A., Hagemeijer A. and Grosveld G.(1992): *Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene*, *Molecular and Cellular Biology*, 12(8), 3346-55.
- 6-15. Minakuchi M., Kakazu N., Gorrin-Rivas M.J., Abe T., Copeland T.D., Ueda K. and Adachi Y.(2001): *Identification and characterization of SEB, a novel protein that binds to the acute undifferentiated leukemia-associated protein SET*, *European Journal of Biochemistry*, 268(5), 1340-51.
- 6-16. Shanley T.P., Vasi N., Denenberg A. and Wong H.R.(2001): *The serine/threonine phosphatase, PP2A: endogenous regulator of inflammatory cell signaling*, *Journal of Immunology*, 166(2), 966-72.
- 6-17. Li H., Okamoto K., Peart M.J. and Prives C.(2009): *Lysine-independent turnover of cyclin G1 can be stabilized by B'alpha subunits of protein phosphatase 2A*, *Molecular and Cellular Biology*, 29(3), 919-28.
- 6-18. Fukukawa C., Shima H., Tanuma N., Okada T., Kato N., Adachi Y. and Kikuchi K.(2005): *The oncoprotein I-2PP2A/SET negatively regulates the MEK/ERK pathway and cell proliferation*, *International Journal of Oncology*, 26(3), 751-6.
- 6-19. Davila M., Jhala D., Ghosh D., Grizzle W.E. and Chakrabarti R.(2007): *Expression of LIM kinase 1 is associated with reversible G1/S phase arrest, chromosomal instability and prostate cancer*, *Molecular Cancer*, 6, 40.
- 6-20. Nakano K., Kanai-Azuma M., Kanai Y., Moriyama K., Yazaki K., Hayashi Y. and Kitamura N.(2003): *Cofilin phosphorylation and actin polymerization by NRK/NESK, a member of the germinal center kinase family*, *Experimental Cell Research*, 287(2), 219-27.
- 6-21. Pope B.J., Zierler-Gould K.M., Kühne R., Weeds A.G. and Ball L.J.(2004): *Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor*, *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4840-8.
- 6-22. Sumi T., Hashigasako A., Matsumoto K. and Nakamura T.(2006): *Different activity regulation and subcellular localization of LIMK1 and LIMK2 during cell cycle transition*, *Experimental Cell Research*, 312(7), 1021-30.
- 6-23. Yang E., Kim H., Lee J., Shin J.S., Yoon H., Kim S.J. and Choi I.H.(2004): *Overexpression of LIM kinase 1 renders resistance to apoptosis in PC12 cells by inhibition of caspase activation*, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24(2), 181-92.
- 6-24. Benner G.E., Dennis P.B. and Masaracchia R.A.(1995): *Activation of an S6/H4 kinase (PAK 65) from human placenta by intramolecular and intermolecular autophosphorylation*, *The Journal of Biological Chemistry*, 270(36), 21121-8.
- 6-25. Jakobi R., McCarthy C.C., Koepfel M.A. and Stringer D.K.(2003): *Caspase-activated PAK-2 is regulated by subcellular targeting and proteasomal degradation*, *The Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38675-85.
- 6-26. Rudel T. and Bokoch G.M.(1997): *Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2*, *Science*, 276(5318), 1571-4.
- 6-27. Vilas G.L., Corvi M.M., Plummer G.J., Seime A.M., Lambkin G.R. and Berthiaume L.G.(2006): *Posttranslational myristoylation of caspase-activated p21-activated protein kinase 2 (PAK2) potentiates late apoptotic events*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6542-7.

- 6-28. Bech-Otschir D., Kraft R., Huang X., Henklein P., Kapelari B., Pollmann C. and Dubiel W.(2001): *COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system*, *The EMBO Journal*, 20(7), 1630-9.
- 6-29. Dechend R., Hirano F., Lehmann K., Heissmeyer V., Ansieau S., Wulczyn F.G., Scheidereit C. and Leutz A.(1999): *The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators*, *Oncogene*, 18(22), 3316-23.
- 6-30. Fang L., Wang X., Yamoah K., Chen P.L., Pan Z.Q. and Huang L.(2008): *Characterization of the human COP9 signalosome complex using affinity purification and mass spectrometry*, *Journal of Proteome Research*, 7(11), 4914-25.
- 6-31. Groisman R., Polanowska J., Kuraoka I., Sawada J., Saijo M., Drapkin R., Kisselev A.F., Tanaka K. and Nakatani Y.(2003): *The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage*, *Cell*, 113(3), 357-67.
- 6-32. Kim B.C., Lee H.J., Park S.H., Lee S.R., Karpova T.S., McNally J.G., Felici A., Lee D.K. and Kim S.J.(2004): *Jab1/CSN5, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor beta signaling by binding to Smad7 and promoting its degradation*, *Molecular and Cell Biology*, 24(6), 2251-62.
- 6-33. Uhle S., Medalia O., Waldron R., Dumdey R., Henklein P., Bech-Otschir D., Huang X., Berse M., Sperling J., Schade R. and Dubiel W.(2003): *Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome*, *The EMBO Journal*, 22(6), 1302-12.
- 6-34. Xin M. and Deng X.(2006): *Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation*, *The Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18859-67.
- 6-35. Deng X., Gao F. and May W.S.(2009): *Protein phosphatase 2A inactivates Bcl2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding*, *Blood*, 113(2), 422-8.

## Chapter 7 放射線等価係数の適用可能性に関する考察

### 7-1 本章の目的

本研究ではここまで、ベンゼンの誘発する白血病を評価対象として、放射線等価係数を用いたリスク評価に関する検討を行ってきた。そこで本章ではまず、ここまで行ってきた検討結果をまとめ、本研究で提案する放射線等価係数を用いたリスク評価の概要と将来像について整理して述べる。

また、放射線等価係数によるリスク評価を実用化するにあたっては、その適用範囲と限界を明らかにすることが必要不可欠であり、白血病以外の様々なエンドポイントに対しても適用例を蓄積し、検証を重ねる必要がある。そこで本章では、アクリロニトリルの誘発する肺がん及び DDT の誘発する肝臓がんに対して放射線等価係数によるリスク評価を適用し、それらの結果から放射線等価係数の適用可能性について考察する。

### 7-2 本研究で提案するリスク評価の概要

まず、Chapter 2-6 で行った検討の概要を述べる。Chapter 2-4 ではヒト正常骨髄細胞を用いた染色体異常試験の結果から決定した放射線等価係数と、PBPK モデルを用いて計算したヒト骨髄中ベンゼン及び代謝物濃度とからベンゼン曝露と等価な放射線量を見積もり、放射線疫学情報に基づいてベンゼンの誘発する白血病リスクを評価した。本評価の結果、ベンゼンにより誘発される白血病の生涯死亡リスクは、大気中ベンゼン 1ppm に対して  $7.3 \times 10^{-4}$ - $2.0 \times 10^{-3}$ 、大気中ベンゼン  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  に対して  $2.5 \times 10^{-7}$ - $6.7 \times 10^{-7}$  となった。この結果は、U.S.EPA による大気中ベンゼン 1ppm に対するリスク値  $7.1 \times 10^{-3}$ - $2.5 \times 10^{-2}$  と比べて 10 倍程度の過小評価であるものの、その元データとして用いられた Crump による Pliofilm™ コホート研究による報告値の範囲に収まっており、*in vitro* 試験に基づく積み上げ型のリスク評価としては良好な評価値が得られたと言える[7-1,2]。また、Chapter 5, 6 では、遺伝子発現変動解析及びタンパク発現変動解析の結果を本リスク評価に適用する可能性について検討し、SET-PP2A-JNK パスウェイ関連機構がベンゼン及び放射線誘発白血病の発症に共通して関連する可能性を見出し、関連遺伝子群及びタンパク質群の白血病リスク評価におけるマーカー候補としての有用性を示唆した。また、遺伝子発現変動パターンの個人差と生体応答の個人差との関連についても考察し、生体応答の差異を遺伝子発現変動パターンの差異に基づいて定量的に表現する方法を提案した。

これらの研究には未だ改善、検討の余地が多くあるが、現時点で得られた知見及び可能性を統合し、新しいリスク評価の将来像として本研究で提案する白血病リスク評価の概要を図 7-1 に示す。

まず、曝露評価として、PBPK モデルを用いて対象物質の外部曝露量（経口摂取量、経気道摂取量、経皮吸収量等）を入力値として対象臓器、すなわちヒト骨髄中の対象物質濃度を計算する。この時、PBPK モデルに用いる各種パラメータに個体差を想定した分布を仮定することで、体内動態評価に代謝の個体差を組み込み、幅を持った値として骨髄中濃度を得ることができる。

次に、用量-反応評価として、ヒト正常骨髄細胞を用いた *in vitro* 毒性試験の結果を対象物質と放射線とで比較し、対象物質の放射線等価係数を決定する。ここで、放射線等価係数の決定にあたっては、白血病に特異的な染色体異常が数多く報告されていること、放射線及び様々な発がん性物質に共通してヒトへの染色体異常誘発が確認されていること等から、現時点では染色体異常が最も有力なマーカーであると言える。染色体異常以外の指標についても、本研究で見出した SET-PP2A-JNK パスウェイをはじめとして様々な遺伝子、タンパク質の関連する生化学的パスウェイと白血病発症との関連に関して日々様々な研究成果が報告されており、今後の知見の蓄積に応じてマーカーとして採用する指標は変わり得り、その修正を通じて本評価はより妥当なモデル

ルへと更新される。また、遺伝子発現パターンの差異をもとに細胞における応答の個体差を定量評価することで、対象物質に対する感受性の個体差を組み込んだ、幅を持つ値として放射線等価係数を算出できる。

こうして得られた対象物質の骨髄中濃度及び放射線等価係数とから、ある曝露に等価な放射線量を見積もることができ、ここに放射線の疫学データに基づくリスク係数を適用することで対象物質の白血病リスクを評価する。本評価では、先述の通り PBPK モデル及び *in vitro* 毒性試験において個体差を考慮した評価を行うことで、代謝及び感受性の個体差を定量的に組み込んだリスク評価を将来的に実現し得ると考えられる。

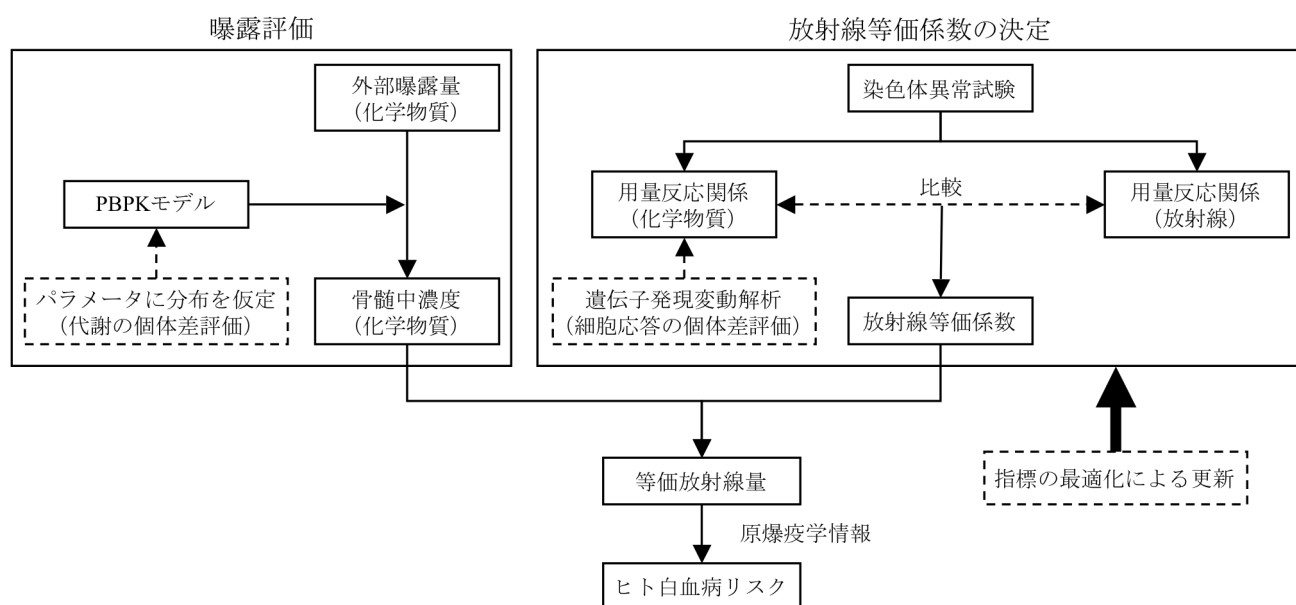


図 7-1 本研究で提案する白血病リスク評価の概要

### 7-3 放射線等価係数を用いたアクリロニトリル誘発肺がんリスク評価

#### 7-3-1 アクリロニトリルとその健康影響

アクリロニトリル (acrylonitrile, ACN) は、分子式  $C_3H_3N$  で表されるニトリルで、常温下で無色透明の液体であり、シアノエチレン、シアン化ビニル等多くの別称を持つ。ACN は重合を起こしやすく、合成繊維や ABS 樹脂、合成ゴムや AS 樹脂といった合成樹脂の材料として広く用いられており、家電製品、自動車、食品容器、化粧品容器等、様々な製品に使用されている他、塗料や化粧品の原料、アクリルアミドの原料としても用いられており、タバコの煙にも含まれている。2007 年の PRTR データによると、わが国では 1 年間に約 300 トンが環境中へ排出されたと見積もられており、曝露経路としては呼吸による吸入摂取、そして飲料水による経口摂取が考えられる[7-3]。

ACN の毒性情報としては、ラット及びイヌへの経口投与により消化器系及び神経系への影響が、ラットへの吸入曝露により呼吸器系及び神経系への影響が認められており、ヒトにおいても職業曝露を受けた労働者で中枢神経系への影響を示す報告がある。また、発がん性については、変異原性、遺伝毒性試験としては、*in vitro* ではネズミチフス菌及び大腸菌による復帰突然変異試験やヒトリンパ球による姉妹染色分体交換試験で陽性の報告がある他、C3H/10T1/2 及び BALB/3T3 細胞に形質転換を誘発することが知られている。一方 *in vivo* では ACN を経口投与したラットの骨髄細胞での染色体異常試験やラットへの経口投与による優性致死試験では

陰性となったが、ACN 及びその代謝物は *in vitro* 及び *in vivo* において DNA と結合することが報告されている。また、発がん性試験においては、ラットでは経口投与及び吸入曝露で脳腫瘍の発生が報告されており、ヒトでは米国での作業者を対象とした疫学研究により肺がん及び前立腺がんの増加が報告されているが、疫学的証拠が十分に確定しているとは考えられていない[7-4]。

IARC では ACN を 'probably carcinogenic to humans' としてグループ 2A に分類している他、ACGIH では 'suspected human carcinogen' として A2 に分類しており、許容濃度 TLV を 2ppm, すなわち  $4.3\text{mg}/\text{m}^3\text{-TWA}$  としている。また、U.S.EPA は、ACN を 'probable human carcinogen' としてグループ B1 に分類しており、Quast のラットに対する経口曝露試験[7-5]等の結果から飲料水中の ACN によるユニットリスクを  $1.5 \times 10^{-4}/[(\mu\text{g}/\text{L})]$  と見積もっており、吸入曝露に対しては O'Berg[7-6]のヒト疫学調査に基づき、大気中 ACN 濃度  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  あたり  $6.8 \times 10^{-5}$  とのユニットリスク値を発表している[7-7]。なお、ここで参照されたラット経口曝露試験でのエンドポイントは脳腫瘍であり、吸入曝露に対するヒト疫学調査でのエンドポイントは肺がんをはじめとする呼吸器がんである。

体内に摂取された ACN は、グルタチオン (Glutathione, GSH) による抱合及び CYP が関与する肝臓中での 2-シアノエチレンオキシド (2-cyanoethylene oxide, CEO) への酸化によって代謝される。この内、GSH による抱合は解毒ステップで、CEO への酸化は活性化ステップであると考えられており、ACN と GSH との抱合はミカエル反応による非酵素的な反応及びグルタチオン S-転移酵素 (glutathione S-transferase, GST) による酵素的な反応の両者によって起こる。更に、生成した CEO は GSH による抱合体を形成して排出されると共にエポキシド加水分解酵素により加水分解されて無毒化すると考えられる。すなわち、ACN の毒性に寄与する代謝物は ACN 及び CEO であり、排泄経路としては ACN と GSH との酵素的または非酵素的な抱合体形成、CEO への酸化後の GSH との抱合体形成及び加水分解が挙げられる[7-6]。以上に述べた ACN の主な代謝経路を図 7-2 に示す[7-8~7-13]。

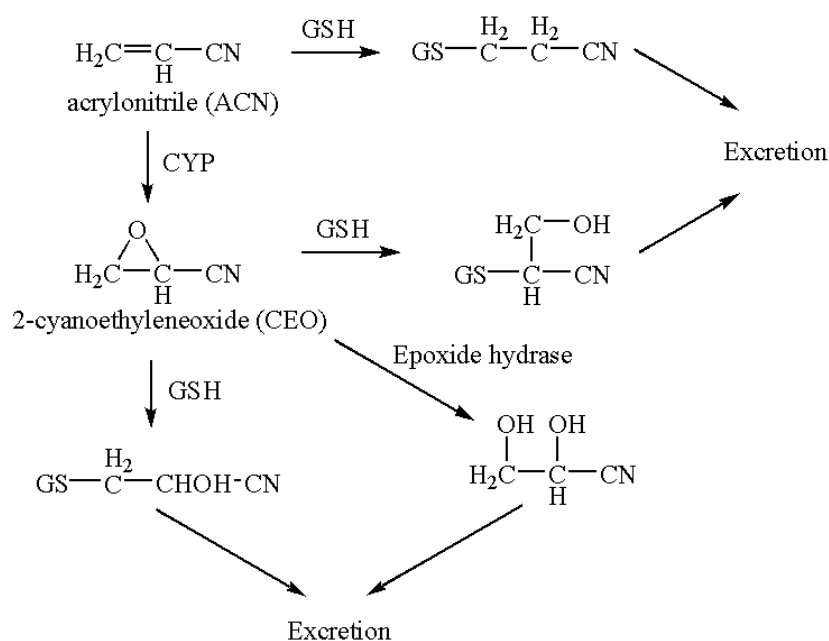


図 7-2 ACN の主な代謝経路[7-8~7-13]



### 7-3-2 本評価法の概要

7-3-1 で述べた通り、ACN のヒトへの発がん性に関しては現時点で疫学的証拠が十分に確定しているとはいえない[7-4]が、O'Berg のヒト疫学調査[7-6]において吸入曝露による呼吸器がんの増加が認められており、U.S. EPA でもこの調査結果に基づいて大気中 ACN に対するユニットリスク値を発表している[7-7]。また、呼吸器がん中でも特に肺がんは、放射線の照射によっても顕著な増加が見られるがんである。そこで、本評価においては ACN のリスク評価のエンドポイントを呼吸器がんの代表である肺がんを設定し、大気中 ACN による肺がんリスクを放射線等価係数を用いて評価することを試みた。なお、放射線等価係数の設定にあたっては、細胞の形質転換を指標とし、*in vitro* 発がん性試験とも呼ばれるトランスフォーメーションアッセイの結果を ACN と放射線とで比較することで放射線等価係数を決定した。ここで、形質転換は細胞のがん化を意味しており、特に固形がんにおいては発症と直接に関連する有用なバイオマーカーたり得ると考えられる。

本評価法の概要を図 7-3 に示す。まず、既存の PBPK モデル[7-14,15]を改良して用いることで、ACN の吸入曝露に対応する標的臓器、すなわち肺組織中の濃度を計算する。その一方で、ACN 曝露及び X 線照射の両者について既に報告例のある C3H/10T1/2 細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイの結果[7-16~7-18]を参照して比較することで ACN の放射線等価係数を決定する。得られた肺組織中濃度及び放射線等価係数とから、ACN の曝露と等価な放射線量を見積もり、放射線の肺に対するリスク係数[7-19]を適用することで ACN 誘発肺がんリスクを評価する。

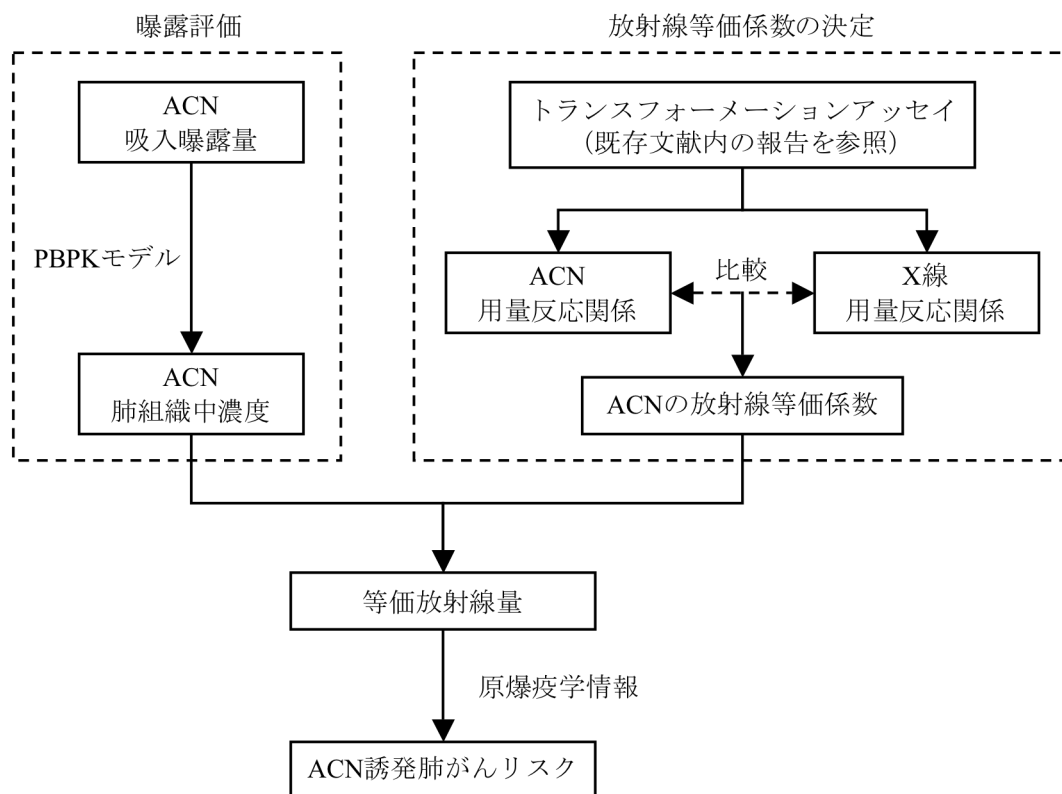


図 7-3 放射線等価係数を用いた ACN 誘発肺がんリスク評価の概要

### 7-3-3 PBPK モデルを用いたアクリロニトリルの体内動態評価

#### 7-3-3-1 構築した PBPK モデルの概要

既存のアクリロニトリルの体内動態評価例としては、ラットを対象とした PBPK モデルを構築した Kedderis らの研究が挙げられる[7-14]。Kedderis らは Gargas らが構築した PBPK モデル[7-20]を元に改良を加え、ACN 及び CEO の体内動態計算結果を F-344 ラットを用いた投与試験結果における血中、脳中、肝臓中の ACN 及び CEO 濃度と比較することでその妥当性を確認している。更に、Sweeney らは、Kedderis らの構築した PBPK モデルに対してパラメータの外挿を行い、ヒトにおける ACN 及び CEO の体内動態として、脳、脂肪、胃、肝臓、そして血中の各物質濃度を予測するモデルを構築している[7-13]。そこで本研究では、Sweeney らの方法に従い、Sweeney らの PBPK モデルを拡張して肺組織中の ACN 及び CEO 濃度を計算可能な PBPK モデルを構築した。本モデルは、肺組織のコンパートメントを追加した点以外は Sweeney らのモデルと同一の構造を採用し、Sweeney らの用いた微分方程式群及びパラメータ群をそのまま適用した。本モデルの構造を図 7-4 に示す。本モデルでは人体を 9 つのコンパートメント（肺組織、脳、脂肪、胃、肝臓、心臓等の血液灌流の豊富な組織群、筋肉等の血液灌流の乏しい組織群、動脈血及び静脈血）に分けてコンパートメント間を血流で結び、酵素的な代謝反応である ACN から CEO への酸化及び CEO の加水分解は肝臓でのみ起こると仮定し、非酵素的な代謝反応である ACN 及び CEO の GSH 抱合反応は GSH を含有する全組織、すなわち血液と脂肪を除くコンパートメントで起こると考えた。また、動脈血及び静脈血のコンパートメントでは ACN 及び CEO とヘモグロビンとの結合を想定し、ヘモグロビンと結合していない遊離状態の ACN 及び CEO のみが他のコンパートメントへの輸送に関与すると考えた。以上の考えに基づき、それぞれのコンパートメント中の ACN 及び CEO に対して質量保存則を適用して物質収支を表現する微分方程式群を作成した。式(7-1)~(7-19)に本モデルで用いた微分方程式群を示す。なお、式(7-1)~(7-19)においては、各コンパートメントを示す添字として、

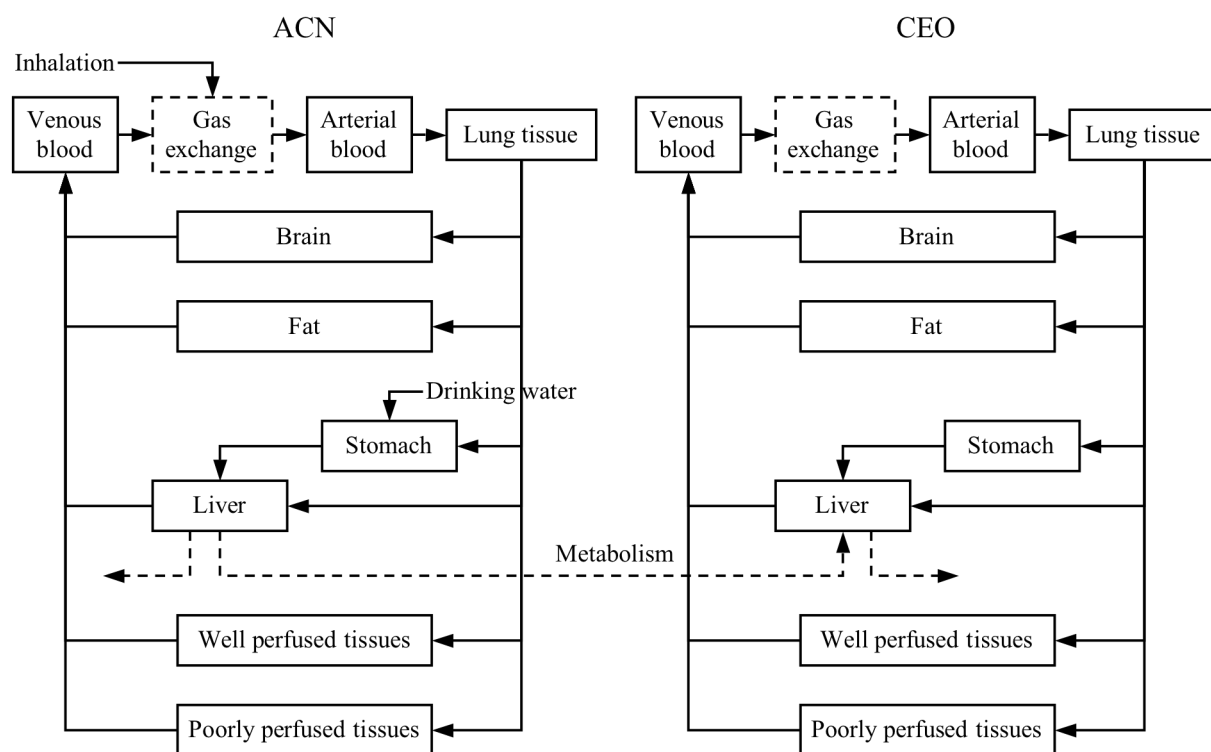


図 7-4 構築した ACN の PBPK モデルの構造

肺組織に対して  $Lu$ , 脳に対して  $Br$ , 脂肪に対して  $F$ , 胃に対して  $St$ , 肝臓に対して  $Li$ , 灌流の豊富な組織群に対して  $W$ , 灌流の乏しい組織群に対して  $P$ , 動脈血に対して  $art$ , 静脈血に対して  $ven$  を、それぞれ用いた。

### ACN

$$\text{Lung tissue : } V_{Lu} \frac{dCa_{Lu}}{dt} = Q_{Lu} \left( Ca_{art2} - \frac{Ca_{Lu}}{Pa_{Lu}} \right) - Kso \cdot Ca_{Lu} \cdot V_{Lu} \cdot GSH_{Lu} \quad (7-1)$$

$$\text{Fat : } V_F \frac{dCa_F}{dt} = Q_F \left( \frac{Ca_{Lu}}{Pa_{Lu}} - \frac{Ca_F}{Pa_F} \right) \quad (7-2)$$

$$\text{Stomach : } V_{St} \frac{dCa_{St}}{dt} = Q_{St} \left( \frac{Ca_{Lu}}{Pa_{Lu}} - \frac{Ca_{St}}{Pa_{St}} \right) + Ka \cdot Ag - Kso \cdot Ca_{St} \cdot V_{St} \cdot GSH_{St} \quad (7-3)$$

$$\text{Liver : } V_{Li} \frac{dCa_{Li}}{dt} = Q_{Li} \frac{Ca_{Lu}}{Pa_{Lu}} + Q_{St} \frac{Ca_{St}}{Pa_{St}} - (Q_{Li} + Q_{St}) \frac{Ca_{Li}}{Pa_{Li}} - Ra - Kfa \frac{Ca_{Li}}{Pa_{Li}} V_{Li} \quad (7-4)$$

$$\text{Brain, Well perfused tissue, Poorly perfused tissue : } V_i \frac{dCa_i}{dt} = Q_i \left( \frac{Ca_{Lu}}{Pa_{Lu}} - \frac{Ca_i}{Pa_i} \right) - Kso \cdot Ca_i \cdot V_i \cdot GSH_i \quad (7-5)$$

$$\text{Venous blood (before binding) : } Ca_{ven1} = \frac{Q_{Br} \frac{Ca_{Br}}{Pa_{Br}} + Q_F \frac{Ca_F}{Pa_F} + (Q_{Li} + Q_{St}) \frac{Ca_{Li}}{Pa_{Li}} + Q_W \frac{Ca_W}{Pa_W} + Q_P \frac{Ca_P}{Pa_P}}{Q} \quad (7-6)$$

$$\text{Venous blood (after binding) : } V_{ven} \frac{dCa_{ven2}}{dt} = Q \cdot (Ca_{ven1} - Ca_{ven2}) - (Kha + Kra) \cdot Ca_{ven2} \cdot V_{ven} \quad (7-7)$$

$$\text{Arterial blood (before binding) : } Ca_{art1} = \frac{Q \cdot Ca_{ven2} + Q_A \cdot C_{inh}}{Q + \frac{Q_A}{Pa_A}} \quad (7-8)$$

$$\text{Arterial blood (after binding) : } V_{art} \frac{dCa_{art2}}{dt} = Q \cdot (Ca_{art1} - Ca_{art2}) - (Kha + Kra) \cdot Ca_{art2} \cdot V_{art} \quad (7-9)$$

### CEO

$$\text{Lung tissue : } V_{Lu} \frac{dCb_{Lu}}{dt} = Q_{Lu} \left( Cb_{art2} - \frac{Cb_{Lu}}{Pb_{Lu}} \right) - 0.1 \cdot Kfb \cdot Ca_{Lu} \cdot V_{Lu} \cdot \frac{GSH_{Lu}}{GSH_{Li}} \quad (7-10)$$

$$\text{Fat : } V_F \frac{dCb_F}{dt} = Q_F \left( \frac{Cb_{Lu}}{Pb_{Lu}} - \frac{Cb_F}{Pb_F} \right) \quad (7-11)$$

Stomach, Brain, Well perfused tissue, Poorly perfused tissue :

$$V_i \frac{dCb_i}{dt} = Q_i \left( \frac{Cb_i}{Pb_i} - \frac{Cb_i}{Pb_i} \right) - 0.1 \cdot Kfb \cdot Ca_i \cdot V_i \cdot \frac{GSH_i}{GSH_{Li}} \quad (7-12)$$

$$\text{Liver : } V_{Li} \frac{dCb_{Li}}{dt} = Q_{Li} \frac{Cb_{Lu}}{Pb_{Lu}} + Q_{St} \frac{Cb_{St}}{Pb_{St}} - (Q_{Li} + Q_{St}) \frac{Cb_{Li}}{Pb_{Li}} + Ra \frac{69.06}{53.06} - Rb - Kfb \frac{Cb_{Li}}{Pb_{Li}} V_{Li} \quad (7-13)$$

$$\text{Venous blood (before binding) : } Cb_{ven1} = \frac{Q_{Br} \frac{Cb_{Br}}{Pb_{Br}} + Q_F \frac{Cb_F}{Pb_F} + (Q_{Li} + Q_{St}) \frac{Cb_{Li}}{Pb_{Li}} + Q_W \frac{Cb_W}{Pb_W} + Q_P \frac{Cb_P}{Pb_P}}{Q} \quad (7-14)$$

$$\text{Venous blood (after binding) : } V_{ven} \frac{dCb_{ven2}}{dt} = Q \cdot (Cb_{ven1} - Cb_{ven2}) - (Khb + Krb) \cdot Ca_{ven2} \cdot V_{ven} \quad (7-15)$$

$$\text{Arterial blood (before binding)} : Cb_{art1} = \frac{Q \cdot Cb_{ven2}}{Q + \frac{Q_A}{Pb_A}} \quad (7-16)$$

$$\text{Arterial blood (after binding)} : V_{art} \frac{dCb_{art2}}{dt} = Q \cdot (Cb_{art1} - Cb_{art2}) - (K_{hb} + K_{rb}) \cdot Cb_{art2} \cdot V_{art} \quad (7-17)$$

### 代謝速度項

$$\text{ACN to CEO} : Ra = \frac{Va_{\max} \frac{Ca_{Li}}{Pa_{Li}}}{Kma + \frac{Ca_{Li}}{Pa_{Li}}} \quad (7-18)$$

$$\text{CEO hydrolysis} : Rb = \frac{Vb_{\max} \frac{Cb_{Li}}{Pb_{Li}}}{Kmb + \frac{Cb_{Li}}{Pb_{Li}}} \quad (7-19)$$

ただし、

$V_i$  : コンパートメント  $i$  の容積[L]

$Ca_i$  : コンパートメント  $i$  中の ACN 濃度[mg/L]

$Cb_i$  : コンパートメント  $i$  中の CEO 濃度[mg/L]

$Q_i$  : コンパートメント  $i$  へと流入する血液流量[L/hr]

$Q$  : 心拍流量[L/hr]

$Q_A$  : 肺換気量[L/hr]

$Pa_i$  : 組織  $i$  における ACN の組織、血液分配係数[-]

$Pb_i$  : 組織  $i$  における CEO の組織、血液分配係数[-]

$Pa_A$  : ACN の血液、空気分配係数[-]

$Pb_A$  : CEO の血液、空気分配係数[-]

$GSH_i$  : 組織  $i$  における GSH 濃度[mM]

$Ka$  : ACN の消化管吸収率[1/hr]

$Ag$  : 消化管中 ACN 量[mg]

$Kso$  : 非酵素的な ACN-GSH 抱合体形成速度係数[L/mmol/hr]

$Kfa$  : 肝臓における酵素的な ACN-GSH 抱合体形成速度係数[1/hr]

$Kfb$  : 肝臓における酵素的な CEO-GSH 抱合体形成速度係数[1/hr]

$Kha$  : 血液における ACN のヘモグロビン結合速度係数[1/hr]

$Khb$  : 血液における CEO のヘモグロビン結合速度係数[1/hr]

$Kra$  : 血液における ACN の RSH 結合速度係数[1/hr]

$Krb$  : 血液における ACN の RSH 結合速度係数[1/hr]

$Va_{\max}$  : 肝臓における ACN から CEO への代謝反応の最大速度[mg/hr]

$Vb_{\max}$  : 肝臓における CEO の加水分解反応の最大速度[mg/hr]

$Kma$  : 肝臓における ACN から CEO への代謝反応の Michaelis-Menten 定数[mg/L]

$Kmb$  : 肝臓における CEO の加水分解反応の Michaelis-Menten 定数[mg/L]

である。

### 7-3-3-2 パラメータ設定

モデル中で用いたパラメータについては、肺組織に関するパラメータを除いては Sweeney らの用いたパラメータ設定値をそのまま適用した[7-13]。肺組織に関するパラメータとしては、組織重量、組織への血流量、GSH 含有量については既存の文献値[7-21,22]を用い、肺における ACN 及び CEO の組織、血液分配係数については測定値が報告されていないため、Sweeney らが脳や胃に対して適用したのと同様に、灌流の豊富な組織群と同一の値を適用した。本モデルで設定したパラメータ値及び元文献の一覧を表 7-1 に示す。

### 7-3-3-3 肺組織中濃度計算結果

構築した PBPK モデルを用いて、肺組織中の ACN 及び CEO 濃度を計算した。想定した曝露シナリオは、大気中濃度  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  の ACN による 70 年間曝露である。曝露開始から 72 時間の肺組織中の ACN 濃度の計算結果を図 7-5 に、CEO 濃度の計算結果を図 7-6 に示す。肺組織中濃度は、ACN, CEO 共に曝露開始から 20 時間程度でほぼ平衡に達し、曝露開始後 40 時間後から 70 年間、ACN 及び CEO 濃度に変化はなかった。計算の結果、曝露開始から 70 年経過後の肺組織中濃度は濃度は ACN で  $4.8 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{mL}$ , CEO で  $1.3 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{mL}$  となった。

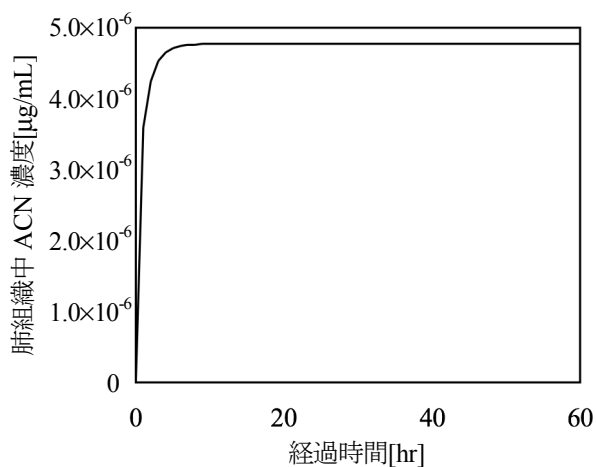


図 7-5 肺組織中 ACN 濃度計算結果

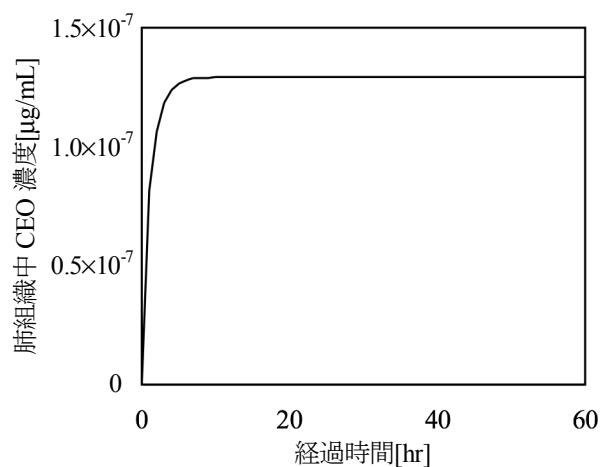


図 7-6 肺組織中 CEO 濃度計算結果

表 7-1 本モデルで設定したパラメータ値の一覧

Parameter		Symbol	Value	Reference
	Body Weight[kg]	$BW$	70	-
Percent of body weight	Lung tissue	$V_{Lu}$	0.76	7-21
	Brain	$V_{Br}$	2.00	7-21
	Fat	$V_F$	21.4	7-21
	Stomach	$V_{St}$	0.21	7-21
	Liver	$V_{Li}$	2.57	7-21
	Well perfused tissues	$V_W$	2.94	7-21
	Poorly perfused tissues	$V_P$	63.1	7-21
	Arterial blood	$V_{St}$	4.35	7-23
	Venous blood	$V_{St}$	2.72	7-23
Flows[L/hr]	Alveolar ventilation	$Q_A$	311	7-21
	Cardiac output	$Q$	299	7-21
Percent of cardiac output[-]	Lung tissue	$Q_{Lu}$	100	-
	Brain	$Q_{Br}$	11.4	7-21
	Fat	$Q_F$	5.2	7-21
	Stomach	$Q_{St}$	1.3	7-24
	Liver	$Q_{Li}$	21.4	7-21
	Well perfused tissues	$Q_W$	32.5	7-21
	Poorly perfused tissues	$Q_P$	28.2	7-21
GSH concentrations[mM]	Lung tissue	$GSH_{Lu}$	1.04	7-22
	Brain	$GSH_{Br}$	2.99	7-15
	Stomach	$GSH_{St}$	3.61	7-15
	Liver	$GSH_{Li}$	5.63	7-15
	Well perfused tissues	$GSH_W$	2.59	7-15
	Poorly perfused tissues	$GSH_P$	1.13	7-15
Partition coefficients of ACN[-]	Blood:air	$Pa_A$	154	7-25
	Lung tissue:blood	$Pa_{Lu}$	1.34	7-26
	Brain:blood	$Pa_{Br}$	1.34	7-26
	Fat:blood	$Pa_F$	0.942	7-26
	Stomach:blood	$Pa_{St}$	1.34	7-26
	Liver:blood	$Pa_{Li}$	1.51	7-26
	Well perfused tissue:blood	$Pa_W$	1.34	7-26
	Poorly perfused tissue:blood	$Pa_P$	1.16	7-26
Partition coefficients of CEO[-]	Blood:air	$Pb_A$	1658	7-26
	Lung tissue:blood	$Pb_{Lu}$	0.273	7-26
	Brain:blood	$Pb_{Br}$	1.40	7-26
	Fat:blood	$Pb_F$	0.78	7-26
	Stomach:blood	$Pb_{St}$	0.273	7-26
	Liver:blood	$Pb_{Li}$	0.273	7-26
	Well perfused tissue:blood	$Pb_W$	0.273	7-26
	Poorly perfused tissue:blood	$Pb_P$	1.84	7-26
Metabolic constants	ACN to CEO Vmax[mg/hr]	$Va_{max}$	305	7-15
	ACN to CEO Km[mg/L]	$Kma$	0.8	7-27
	CEO hydrolysis Vmax[mg/hr]	$Vb_{max}$	16458	7-15
	CEO hydrolysis Km[mg/L]	$Kmb$	113	7-28
	ACN-GSH conjugation, enzymatic[/hr]	$Kfa$	31.6	7-15
	ACN-GSH conjugation, nonenzymatic[L/mmol/hr]	$Kso$	0.258	7-14
	CEO-GSH conjugation, enzymatic[/hr]	$Kfb$	55.1	7-15
Binding constants in blood[/hr]	ACN to hemoglobin	$Kha$	1.25	7-20
	CEO to hemoglobin	$Khb$	1.13	7-20
	ACN to blood RSH	$Kra$	0.0008	7-15
	CEO to blood RSH	$Krb$	0.84	7-20
Oral absorption rate[/hr]		$Ka$	8	7-14

### 7-3-4 放射線等価係数の決定

ACN の放射線等価係数の決定にあたっては、Banerjee らの研究成果における、C3H/10T1/2 細胞を用いた ACN のトランスフォーメーションアッセイの結果[7-16]を、Terzaghi ら及び Han らの研究における、同じく C3H/10T1/2 細胞を用いた X 線のトランスフォーメーションアッセイの結果[7-17,18]と比較した。なおここで、ACN のリスク評価にあたっては毒性に寄与する代謝物として ACN の他に CEO が考えられるが、ヒトではラット等と比べて CEO とグルタチオンの抱合が速く、7-3-1 で述べたエポキシド加水分解酵素による加水分解が行われることも相まって CEO は速やかに無毒化されると考えられ、実際に 7-3-3 で行った体内動態評価においても肺組織中の CEO 濃度は ACN 濃度の約 40 分の 1 程度である。また、CEO は ACN よりも容易に DNA と反応するものの、その反応生成物は不安定で毒性への寄与は小さいとする報告[7-29]もあり、CEO の発がんへの寄与を疑問視する見方もある。以上の背景から、本研究では CEO の肺がん発症への寄与は ACN と比べ充分小さいと考え、毒性に寄与する代謝物として ACN のみを採用して評価を行った。

図 7-7 に Banerjee らが行った、C3H/10T1/2 細胞を用いた ACN のトランスフォーメーションアッセイの結果[7-16]を、図 7-8 及び図 7-9 に Terzaghi ら及び Han らの研究における、C3H/10T1/2 細胞を用いた X 線のトランスフォーメーションアッセイの結果[7-17,18]を、それぞれ示す。なお、横軸はそれぞれの曝露量を示し、縦軸は生細胞 1 細胞あたりの形質転換頻度である。図 7-7~7-9 に示した ACN 及び X 線曝露による形質転換頻度の用量反応関係を、Chapter 3-6 と同様に LQ モデル及び Weibull モデルを用いて回帰した。得られた回帰式を式(7-20)~(7-25)に示す。なお、X-ray1 は図 7-8 の回帰式を、X-ray2 は図 7-9 の回帰式を示す。

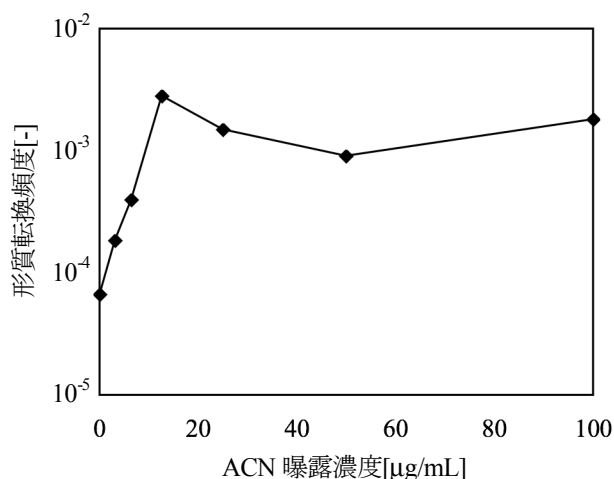


図 7-7 ACN によるトランスフォーメーションアッセイ (Banerjee S. and Segal A.[7-16])

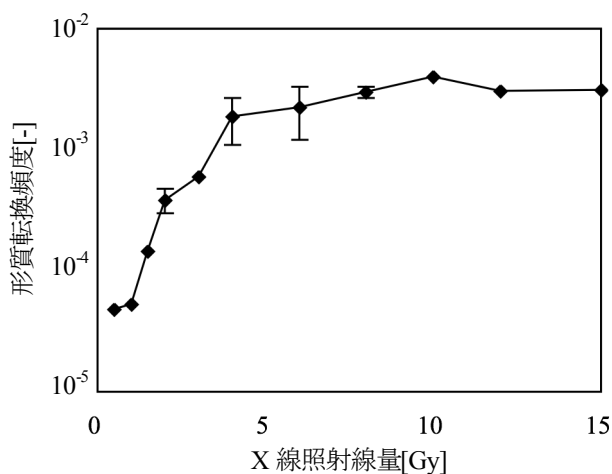


図 7-8 X 線によるトランスフォーメーションアッセイ 1 (Terzaghi M. and Little J.B.[7-17])

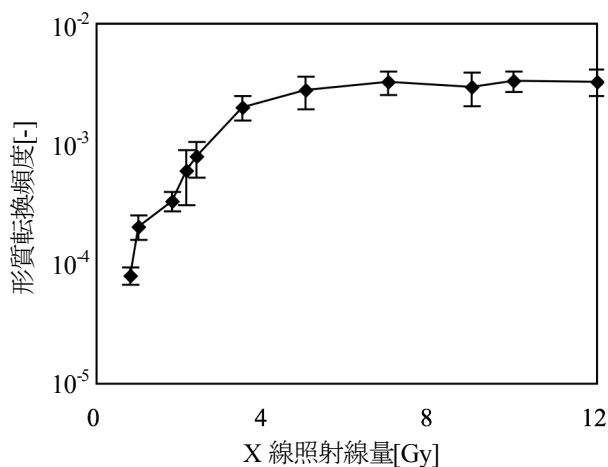


図 7-9 X 線によるトランスフォーメーションアッセイ 2 (Han A. and Elkind M.M.[7-18])

### LQ モデル

$$\text{ACN (図 7-7)} : y = 1 - \exp\left\{-(3.97 \times 10^{-5} C_{ACN} - 2.25 \times 10^{-7} C_{ACN}^2)\right\} (R^2 = 0.85) \quad (7-20)$$

$$\text{X-ray1 (図 7-8)} : y = 1 - \exp\left\{-(4.81 \times 10^{-4} D_X - 1.70 \times 10^{-5} D_X^2)\right\} (R^2 = 0.95) \quad (7-21)$$

$$\text{X-ray2 (図 7-9)} : y = 1 - \exp\left\{-(5.65 \times 10^{-4} D_X - 2.33 \times 10^{-5} D_X^2)\right\} (R^2 = 0.93) \quad (7-22)$$

### Weibull モデル

$$\text{ACN (図 7-7)} : y = 1 - \exp(2.19 \times 10^{-4} C_{ACN}^{0.452}) (R^2 = 0.90) \quad (7-23)$$

$$\text{X-ray1 (図 7-8)} : y = 1 - \exp(4.88 \times 10^{-4} D_X^{0.774}) (R^2 = 0.91) \quad (7-24)$$

$$\text{X-ray2 (図 7-9)} : y = 1 - \exp(5.61 \times 10^{-4} D_X^{0.778}) (R^2 = 0.93) \quad (7-25)$$

ここで、

$y$  : 形質転換頻度[-]

$C_{ACN}$  : ACN 濃度[ $\mu\text{g/mL}$ ]

$D_X$  : X 線の線量[Gy]

である。

これらの回帰曲線を用いて、形質転換頻度  $0 \sim 10^{-3}$  の範囲で、ある形質転換頻度に対応する ACN 濃度及び X 線線量をプロットした。結果を LQ モデル、Weibull モデルそれぞれについて、ACN と X-ray1 との比較結果を図 7-10,7-11 に、ACN と X-ray2 との比較結果を図 7-12,7-13 に示し、それぞれのプロットを原点を通る二次曲線で回帰した回帰式を式(7-26)~(7-29)に示す。これらの回帰式はプロットと非常に高い相関を示しており、また、7-3-3 で計算した肺組織中 ACN 濃度  $4.8 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$  程度の濃度レベルでは線形性が仮定できると考えられるため、ここではそれぞれの回帰式における一次係数を ACN の放射線等価係数とした。すなわち、LQ モデルに基づいた場合、ACN の放射線等価係数は、X-ray1 との比較で  $0.0832[\text{Gy}/(\mu\text{g/mL})]$ 、X-ray2 との比較で  $0.0709 [\text{Gy}/(\mu\text{g/mL})]$  となり、Weibull モデルに基づいた場合、X-ray1 との比較で  $0.164[\text{Gy}/(\mu\text{g/mL})]$ 、X-ray2 との比較で  $0.137[\text{Gy}/(\mu\text{g/mL})]$  となった。

### LQ モデル

$$\text{X-ray1 (図 7-10)} : D_X = -0.0003C_{ACN}^2 + 0.0832C_{ACN} (R^2 = 1.0) \quad (7-26)$$

$$\text{X-ray2 (図 7-12)} : D_X = -0.0003C_{ACN}^2 + 0.0709C_{ACN} (R^2 = 1.0) \quad (7-27)$$

### Weibull モデル

$$\text{X-ray1 (図 7-11)} : D_X = -0.0027C_{ACN}^2 + 0.164C_{ACN} (R^2 = 0.98) \quad (7-28)$$

$$\text{X-ray2 (図 7-13)} : D_X = -0.0022C_{ACN}^2 + 0.139C_{ACN} (R^2 = 0.98) \quad (7-29)$$



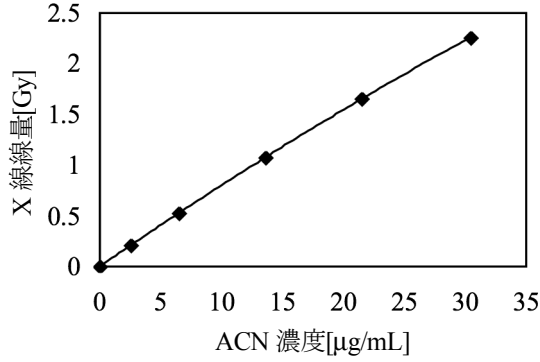


図 7-10 ACN 濃度と X 線線量との関係  
(LQ モデル、Xray1 との比較)

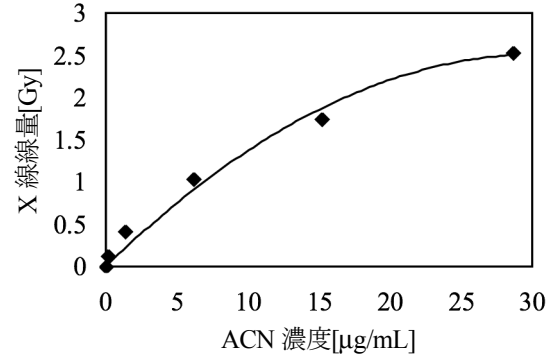


図 7-11 ACN 濃度と X 線線量との関係  
(Weibull モデル、Xray1 との比較)

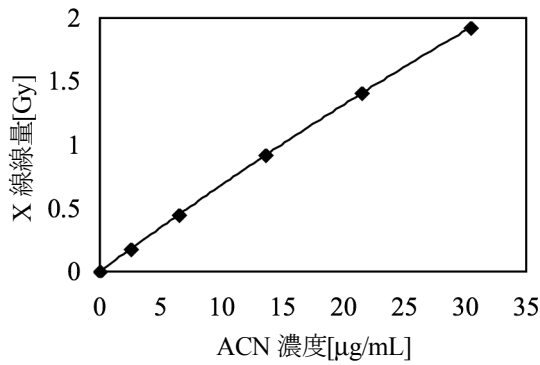


図 7-12 ACN 濃度と X 線線量との関係  
(LQ モデル、Xray2 との比較)

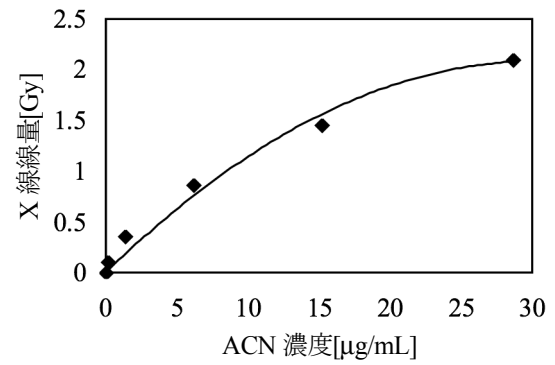


図 7-13 ACN 濃度と X 線線量との関係  
(Weibull モデル、Xray2 との比較)

### 7-3-5 アクリロニトリル誘発肺がんリスク評価

7-3-3 で計算した肺組織中 ACN 濃度及び 7-3-4 で決定した ACN の放射線等価係数を用いて、4-3 でベンゼン誘発白血病リスクの評価に用いたのと同様の以下の式(7-30)に基づいて ACN 誘発肺がんリスクを評価した。

$$\begin{aligned}
 R_{ACN} &= D_{ex} \cdot R_{radiation} \\
 &= \frac{D_{in}}{OC_{Lu}} R_{radiation} \\
 &= \frac{C_{ACN} \cdot REC_{ACN} \cdot DDREF}{OC_{Lu}} R_{radiation}
 \end{aligned} \tag{7-30}$$

ここで、

$R_{ACN}$  : ACN 誘発肺がんリスク

$R_{radiation}$  : 放射線のリスク係数[-/Gy]

$D_{ex}$  : 全身等価放射線量[Gy]

$D_{in}$  : 肺組織中等価放射線量[Gy]

$OC_{Lu}$  : 肺の臓器分配係数[-]

$C_{ACN}$  : ACN の肺組織中濃度[μg/mL]

$REC_{ACN}$  : ACN の放射線等価係数[Gy/(μg/mL)]

$DDREF$  : 線量・線量率効果係数[-]

である。

なお、4-3 と同様に、肺の臓器分配係数  $OC_{Lu}$  は 0.1MeV~0.25MeV の放射線に対する文献値 0.6-1.3[7-30]を用い、線量・線量率効果係数  $DDREF$  は ICRP の推奨値 2[7-31]を採用した。また、放射線のリスク係数  $R_{radiation}$  としては ICRP による肺に対するがん死亡生涯リスク  $8.5 \times 10^{-3}$  [Sv]を採用した[7-19]。なお、X 線の線質係数は 1 であり、1Gy=1Sv として計算を行った。計算結果を表 7-2 に示す。放射線等価係数を用いた評価の結果、ACN により誘発される肺がんの生涯死亡リスクは、大気中 ACN  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  に対して  $4.4 \times 10^{-9}$ - $2.2 \times 10^{-8}$  となった。このリスク計算値は、U.S.EPA によるユニットリスク値  $6.8 \times 10^{-5}$  [7-7]と比べて、3,000 分の 1 から 15,000 分の 1 程度小さな値となった。

表 7-2 放射線等価係数を用いた ACN 誘発肺がんリスク評価

X線比較データ 回帰モデル	Xray1		Xray2	
	LQ	Weibull	LQ	Weibull
放射線等価係数[Gy/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )]	$8.3 \times 10^{-2}$	$7.1 \times 10^{-2}$	$1.6 \times 10^{-1}$	$1.4 \times 10^{-1}$
肺組織中等価放射線量[Gy]	$7.9 \times 10^{-7}$	$6.8 \times 10^{-7}$	$2.6 \times 10^{-6}$	$2.2 \times 10^{-6}$
全身等価放射線量[Gy]	$6.1 \times 10^{-7}$ - $1.3 \times 10^{-6}$	$5.2 \times 10^{-7}$ - $1.1 \times 10^{-6}$	$1.2 \times 10^{-6}$ - $2.6 \times 10^{-6}$	$1.0 \times 10^{-6}$ - $2.2 \times 10^{-6}$
肺がんリスク計算値	$5.2 \times 10^{-9}$ - $1.1 \times 10^{-8}$	$1.0 \times 10^{-8}$ - $2.2 \times 10^{-8}$	$4.4 \times 10^{-9}$ - $9.6 \times 10^{-9}$	$8.5 \times 10^{-9}$ - $1.9 \times 10^{-8}$

## 7-4 放射線等価係数を用いた DDT 誘発肝臓がんリスク評価

### 7-4-1 DDT とその健康影響

DDT (dichloro-diphenyl-trichloroethane) は分子式  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_5$  で表される有機塩素系化合物で、常温で白色の固体である。DDT は日本では化審法（化学物質審査規制法）で「特定化学物質」に指定されており、現在ではあらゆる用途における製造、販売、使用が禁止されているが、1971 年までは農薬や家庭用殺虫剤としてまた、1981 年までは木材等のシロアリ駆除剤として、数多くの農作物や樹木に使用されていた[7-32]。なお、インドをはじめ一部の発展途上国においては、現在においても感染症の予防や公衆衛生等の目的で使用されている。

DDT は体内に摂取されると、GST による触媒作用を受けるジハイドロウロリネーション過程を経て DDE (dichloro-diphenyl-dichloroethylene) に代謝される[7-33]。DDE は DDT と同様常温下で白色の固体であり、分子式  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{Cl}_4$  の有機塩素系化合物である。DDT から DDE への代謝反応を図 7-14 に示す。DDE は体内でそれ以上の代謝を受けることがなく、脂溶性が高いために脂肪に蓄積されやすい[7-34]。

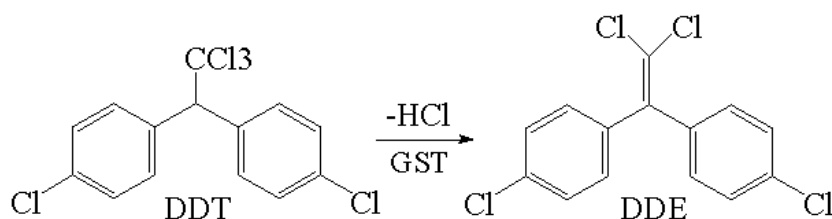


図 7-14 DDT 及び DDE の構造式とその代謝反応

DDT の健康影響については、神経毒性をはじめとして、再生不良性貧血や肝腎障害など、様々な毒性が知られている[7-35]。また、DDT 及び DDE の発がん性については、DDT は発がんイニシエーターであると言われており、DDT の最終発がん物質は DDE であるとする報告もある[7-36]。DDT に関してはマウス及びラットを対象とした動物実験において発がん性が認められており、主に肝臓に腫瘍の形成が観察されたことから、DDT による発がんの主要な標的臓器は肝臓であるとされる[7-37]。一方ヒトについては膀胱がんなどの関連が示唆されているものの未だその情報は限定的であり、IARC では DDT を‘possibly carcinogenic to humans’としてグループ 2B に分類している[7-38]。また、U.S.EPA では‘probable human carcinogen’としてグループ B2 に分類しており、RfD (Reference Dose) として  $5 \times 10^{-4}$  [mg/kg/day] を提唱し、マウス及びラットを用いた動物実験の結果に基づき、発がん、主に肝臓がんに関する Slope Factor を 0.34 [mg/kg/day] としている[7-37]。

#### 7-4-2 本評価法の概要

7-4-1 で述べたように、DDT による発がんの主要な標的臓器は肝臓であるとされる[7-37]。そこで、本評価においては DDT による肝臓がんリスクを放射線等価係数を用いて評価することを試みた。なお、放射線等価係数の設定にあたっては 7-3 と同様に細胞の形質転換を指標とし、*in vitro* トランスフォーメーションアッセイの結果に基づいて DDT の放射線等価係数を決定した。

本評価の基本的な枠組みは 7-3 で行った ACN の肺がんリスク評価と同様であり、その概要を図 7-15 に示す。まず、既存の PBPK モデル[7-39,40]を改良して用いることで、DDT の曝露に対応する標的臓器、すなわち肝臓中の濃度を計算する。その一方で、DDT 曝露及び X 線照射の両者について既に報告例のある BALB/3T3 細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイの結果[7-41,42]を比較することで放射線等価係数を決定する。

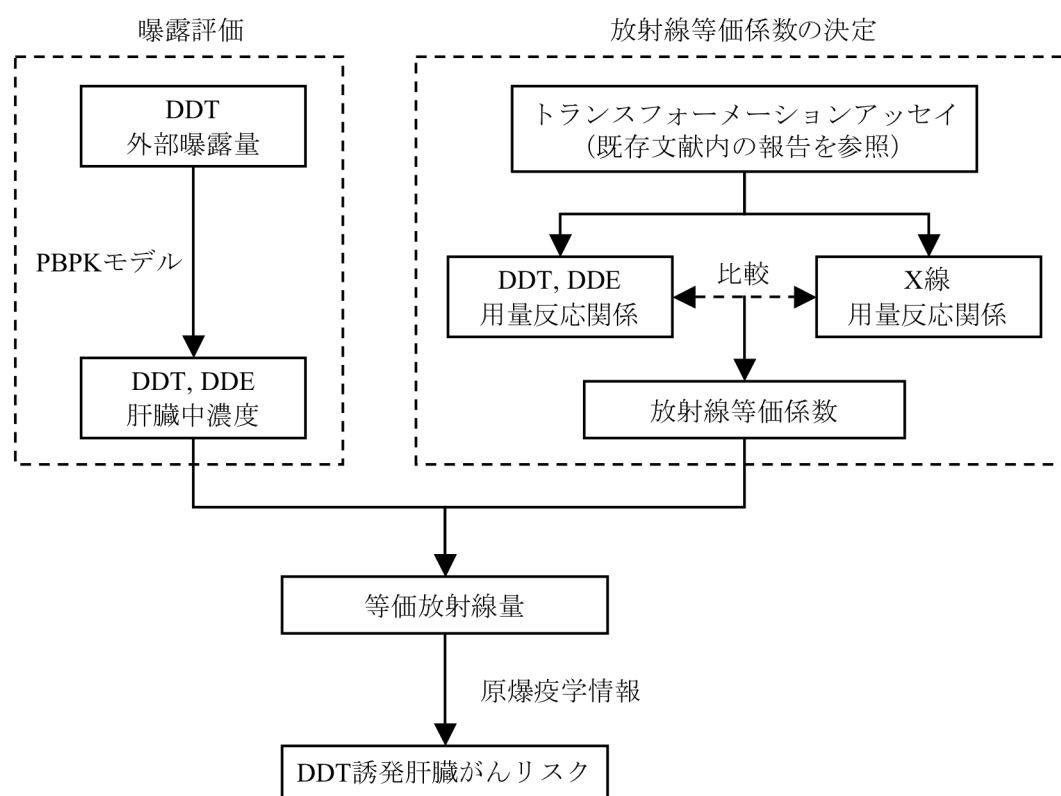


図 7-15 放射線等価係数を用いた DDT 誘発肝臓がんリスク評価の概要

得られた肝臓中濃度及び放射線等価係数とから、DDT の曝露と等価な放射線量を見積もり、放射線の肝臓に対するリスク係数[7-19]を適用することで DDT 誘発肝臓がんリスクを評価する。

### 7-4-3 PBPK モデルを用いた DDT の体内動態評価

#### 7-4-3-1 構築した PBPK モデルの概要

DDT の体内動態評価には、菱川、深見らが、You らの PBPK モデル[7-43]をもとに構築した PBPK モデル[7-39, 40]を改良して用いた。従来のモデルでは、DDT の経口摂取に関して消化管のコンパートメントを用いた計算を行っていたが、消化管自体は標的組織でなくその組織中濃度は重要でないため、パラメータ設定の差異の不確定要素を可能な限り排除すべきとの観点から、本モデルでは消化管のコンパートメントを削除し、糞便排泄量と経口摂取量、吸収量に関する質量保存の関係式を追加することで同様の計算を実現した。本モデルの構造を図 7-16 に示す。本モデルでは女性を対象として人体を 9 つのコンパートメント（肝臓、腎臓、脂肪、乳房組織、子宮、脳、血液灌流の豊富な組織群、血液灌流の乏しい組織群、動脈血）に分けてコンパートメント間を血流で結び、肝臓においては DDT から DDE への代謝反応を考慮した。各々のコンパートメント中の DDT 及び DDE に対して質量保存則を適用して物質収支を表現する微分方程式群を作製した。式(7-31)~(7-40)に本モデルで用いた微分方程式群を示す。なお、各コンパートメントを示す添字として、肝臓に対して  $L_i$ 、腎臓に対して  $K_i$ 、脂肪に対して  $F$ 、乳房組織に対して  $M_i$ 、子宮に対して  $U_i$ 、脳に対して  $Br$ 、灌流の豊富な組織群に対して  $W$ 、灌流の乏しい組織群に対して  $P$ 、動脈血に対して  $art$  を、それぞれ用いた。

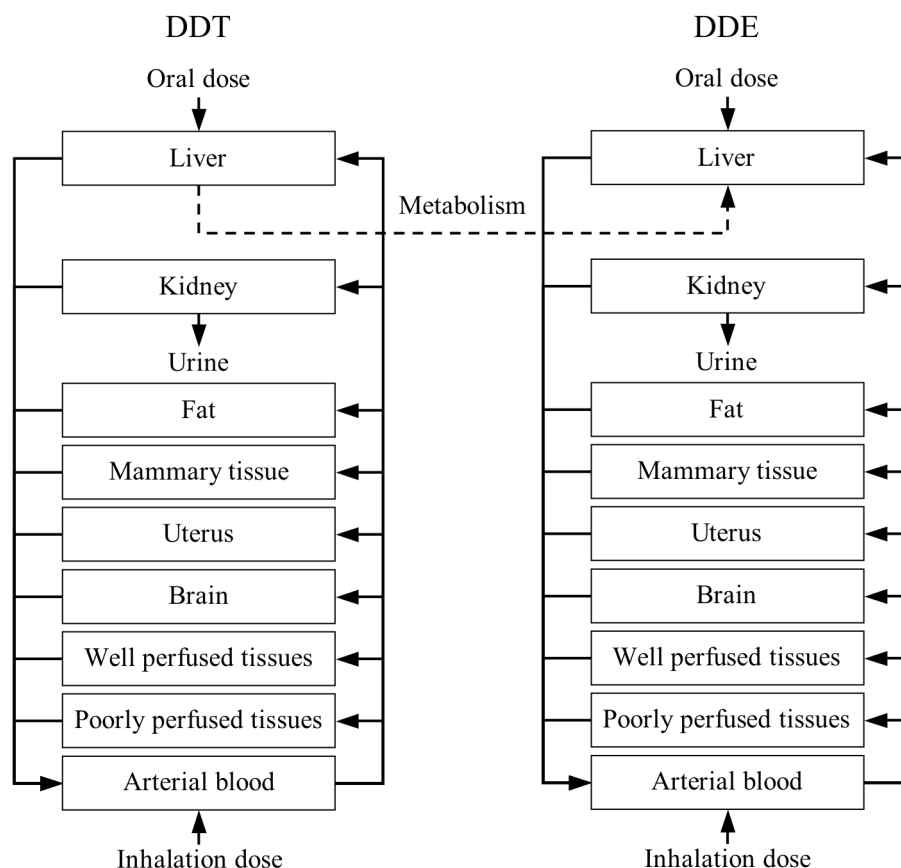


図 7-16 構築した DDT の PBPK モデルの構造

## DDT

$$\text{Liver : } V_{Li} \frac{dCt_{Li}}{dt} = Q_{Li} (Ct_{art} - \frac{Ct_{Li}}{Pt_{Li}}) - \frac{dmet}{dt} + K_{AS} Dt_{oral} \quad (7-31)$$

$$\text{Kidney : } V_{Ki} \frac{dCt_{Ki}}{dt} = Q_{Ki} (Ct_{art} - \frac{Ct_{Ki}}{Pt_{Ki}}) - K_E \frac{Ct_{Ki}}{Pt_{Ki}} \quad (7-32)$$

$$\text{Arterial blood : } V_{art} \frac{dCt_{art}}{dt} = \sum Q_{ti} (\frac{Ct_{ti}}{Pt_{ti}} - Ct_{art}) \quad (7-33)$$

$$\text{Other compartments : } V_i \frac{dCt_i}{dt} = Q_i (Ct_{art} - \frac{Ct_i}{Pt_i}) \quad (7-34)$$

## DDE

$$\text{Liver : } V_{Li} \frac{dCe_{Li}}{dt} = Q_{Li} (Ce_{art} - \frac{Ce_{Li}}{Pb_{Li}}) + \frac{dmet}{dt} + K_{AS} De_{oral} \quad (7-35)$$

$$\text{Kidney : } V_{Ki} \frac{dCe_{Ki}}{dt} = Q_{Ki} (Ce_{art} - \frac{Ce_{Ki}}{Pe_{Ki}}) - K_E \frac{Ce_{Ki}}{Pe_{Ki}} \quad (7-36)$$

$$\text{Arterial blood : } V_{art} \frac{dCe_{art}}{dt} = \sum Q_{ti} (\frac{Ce_{ti}}{Pe_{ti}} - Ce_{art}) \quad (7-37)$$

$$\text{Other compartments : } V_i \frac{dCe_i}{dt} = Q_i (Ce_{art} - \frac{Ce_i}{Pt_i}) \quad (7-38)$$

## 代謝速度項等

$$\text{DDT to DDE : } dmet = K_F V_{Li} C_{Li} \quad (7-39)$$

$$\text{Excretion : } D_{feces} = D_{oral} (1 - K_{AS}) \quad (7-40)$$

ただし、

$V_i$  : コンパートメント  $i$  の容積[L]

$Q_i$  : コンパートメント  $i$  へと流入する血液流量[L/hr]

$Ct_i$  : コンパートメント  $i$  中の DDT 濃度[mg/L]

$Ce_i$  : コンパートメント  $i$  中の DDE 濃度[mg/L]

$Pt_i$  : 組織  $i$  におけるDDTの組織、血液分配係数[-]

$Pe_i$  : 組織  $i$  におけるDDEの組織、血液分配係数[-]

$D_{total}$  : DDTの経口摂取量[mg/kg/hr]

$De_{oral}$  : DDEの経口摂取量[mg/kg/hr]

$K_{AS}$  : 吸収に関わる係数[-]

$K_E$  : 排出に関わる係数[L/hr]

$K_F$  : 代謝に関わる係数[-]

である。

## 7-4-3-2 パラメータ設定

本モデル中のパラメータは、組織容積や血流量等のヒトに固有の生理学的パラメータについては Brown らが提示した文献値を採用した[7-21]。また、血液、組織間の分配係数等の各化学物質に固有の物理学的パラメータについては Mussalo の示した脂肪組織の血液、組織間分配率[7-44]を基準に、それ以外のパラメータは You

らの行ったラットを用いた動物実験における値[7-43]を参考に、パラメータフィッティングにより調整した。代謝、排泄速度等に関する生化学的パラメータについてはヒトに関する情報が不足しており、吸収率、尿排出率、代謝率はパラメータフィッティングにより決定した。本モデルで設定したパラメータ値及び元文献の一覧を表 7-3 に示す。

表 7-3 本モデルで設定したパラメータ値の一覧

Parameter		Symbol	Value	Reference
	Body Weight[kg]	$BW$	55	-
Percent of body weight	Liver	$V_{Li}$	2.6	7-21
	Kidney	$V_{Ki}$	0.4	7-21
	Fat	$V_F$	21.4	7-21
	Mammary tissue	$V_{Mt}$	4.4	7-21
	Uterus	$V_{Ut}$	0.9	7-21
	Brain	$V_{Br}$	2.0	7-21
	Well perfused tissues	$V_W$	12.2	7-21
	Poorly perfused tissues	$V_P$	34.1	7-21
Flows[L/hr]	Alveolar ventilation	$Q_A$	$15 \times BW^{0.74}$	7-21
	Cardiac output	$Q$	300	7-21
Percent of cardiac output[-]	Liver	$Q_{Li}$	27.0	7-21
	Kidney	$Q_{Ki}$	17.0	7-21
	Fat	$Q_F$	8.5	7-21
	Mammary tissue	$Q_{Mt}$	2.8	7-21
	Uterus	$Q_{Ut}$	0.5	7-21
	Brain	$Q_{Br}$	12.0	7-21
	Well perfused tissues	$Q_W$	12.7	7-21
	Poorly perfused tissues	$Q_P$	17.0	7-21
Partition coefficients[-]	Liver	$P_{Li}$	5.0	7-43
	Kidney	$P_{Ki}$	3.0	7-43
	Fat (DDT)	$P_{tF}$	400	7-44
	Fat (DDE)	$P_{eF}$	200	7-44
	Mammary tissue	$PM_t$	6.0	7-43
	Uterus	$P_{Ut}$	3.0	7-43
	Brain	$P_{Br}$	3.0	7-43
	Well perfused tissues	$P_W$	3.0	7-43
	Poorly perfused tissues	$P_P$	6.0	7-43
Oral absorption rate[-]		$K_{AS}$	1	fitting
Excretion rate[L/hr]		$K_E$	0.005	fitting
Metabolic constant[-]		$K_F$	0.15	fitting

### 7-4-3-3 モデルの検証

構築した PBPK モデルによる計算結果を、Morgan らの行ったヒトを対象とした DDT 投与実験の結果[7-45]と比較することでモデルの検証を行った。Morgan らの実験では、体重 59.9kg の 52 歳女性を対象として、52 日間にわたって DDT を食事に添加することにより 5mg/day の経口曝露を行い、曝露開始から 3 年間の脂肪中及び血液中濃度を測定している。本モデルでも同じ曝露条件を設定し、脂肪中 DDT 及び DDE 濃度、血液中 DDT 濃度について計算結果を実測データと比較した。結果を図 7-17~7-19 に示す。脂肪中 DDT 濃度において計算値が実測値よりやや高い濃度となる結果ではあるが、これらの計算値は時間推移による濃度変化など、

実測データをよく再現できており、本モデルは DDT 及び DDE の体内動態を良好に再現するモデルであると言える。

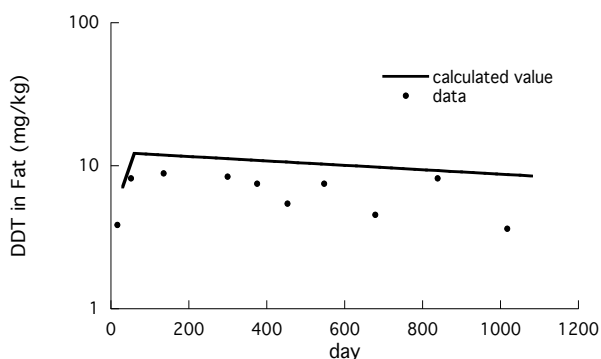


図 7-17 PBPK モデル検証結果：脂肪中 DDT 濃度

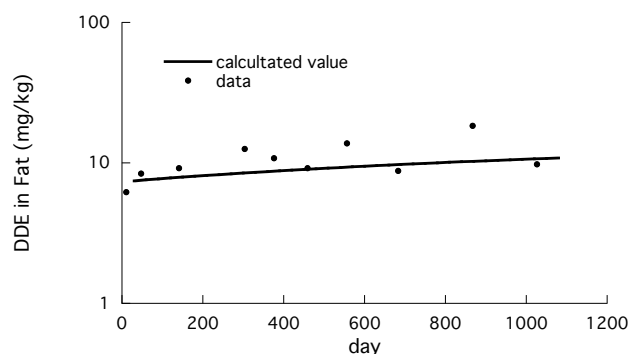


図 7-18 PBPK モデル検証結果：脂肪中 DDE 濃度

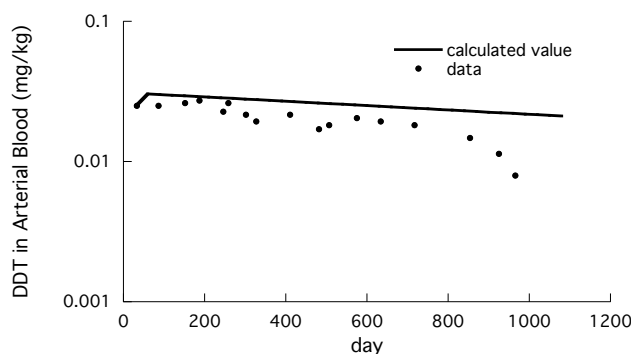


図 7-19 PBPK モデル検証結果：血液中 DDT 濃度

#### 7-4-3-4 肝臓中濃度計算結果

本 PBPK モデルを用いて、肝臓中の DDT 及び DDE 濃度を推定した。評価対象は 1950 年生まれ、体重 55kg の平均的な女性とし、0 歳から 80 歳までの肝臓中 DDT 及び DDE 濃度の推移を計算した。なお、計算対象とする女性の懐胎、授乳は脂溶性物質である DDT、DDE の排泄に関わるが、ここでは考慮しないものとした。また、曝露シナリオとしては、深見らが構築したフガシティモデル、曝露評価モデルに基づいて算定される経口摂取量及び経気道摂取量[7-40]を用いた。図 7-20,7-21 に用いた DDT の経口摂取量及び経気道摂取量を、図 7-22,7-23 に肝臓中 DDT 及び DDE 濃度の計算結果を示す。図中の系列 avg, max, min はそれぞれ、DDT 曝露量が平均値、最大値、最小値を取る曝露シナリオに基づく結果を示す。

DDT は DDE へと代謝されるため、図 7-22,7-23 に見られるように、DDT は減少傾向にあるのに対して DDE は増加傾向にあり、最終的には DDT よりも DDE の方が 100 倍程度高濃度で肝臓へ蓄積する結果となった。また、肝臓中 DDE 濃度は 42 歳でピークに達し、その後平衡状態となった。そこで本研究では、平均的な日本人女性の寿命を 80 年とし、生涯における肝臓中 DDE 濃度が最大値の時に細胞ががん化し、その後潜伏期間を経て発症、死に至ると仮定し、DDT の肝臓がんリスク評価には表 7-4 に示す 42 歳時点での肝臓中 DDT 及び DDE 濃度を採用した。

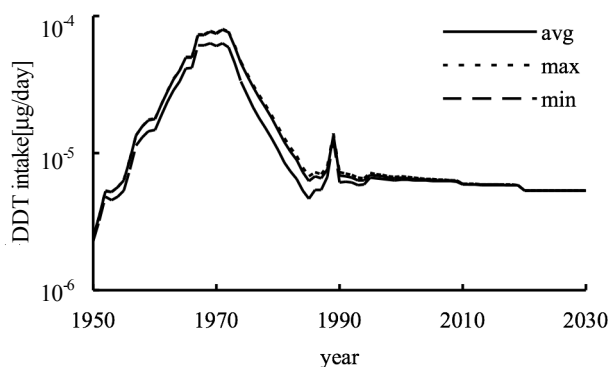


図 7-20 曝露シナリオ：DDT 経口摂取量

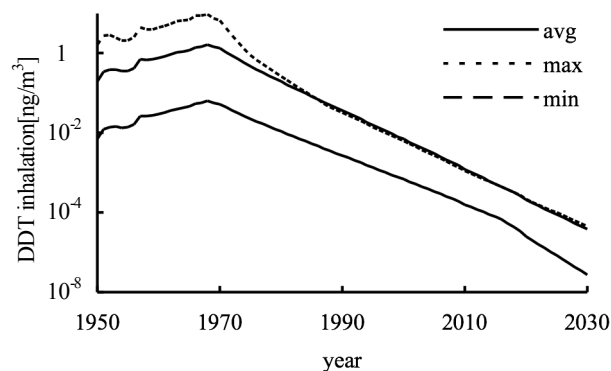


図 7-21 曝露シナリオ：DDT 経気道摂取量

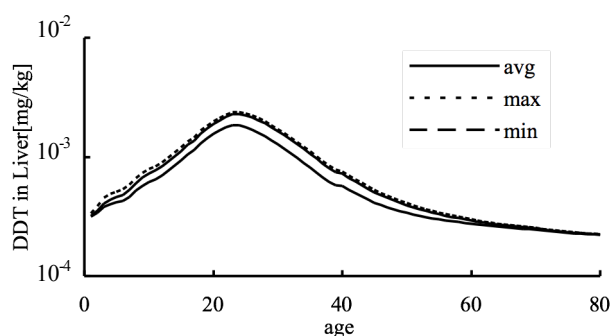


図 7-22 肝臓中 DDT 濃度計算結果

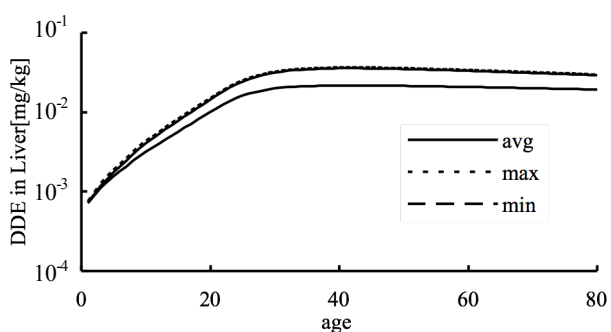


図 7-23 肝臓中 DDE 濃度計算結果

表 7-4 42 歳時点での肝臓中 DDT 及び DDE 濃度

曝露シナリオ	肝臓中濃度[mg/kg]	
	DDE	DDT
Min	$2.16 \times 10^{-2}$	$4.94 \times 10^{-4}$
Avg	$3.57 \times 10^{-2}$	$6.19 \times 10^{-4}$
Max	$3.67 \times 10^{-2}$	$6.48 \times 10^{-4}$

#### 7-4-4. 放射線等価係数の決定

放射線等価係数は、*in vitro* トランスフォーメーションアッセイの結果に基づいて決定した。篠本は、BALB/3T3 細胞に DDT 及び DDE を曝露して 2 段階トランスフォーメーションアッセイを行い、DDT、DDE の発がんイニシエーター活性及びプロモーター活性の有無を確認すると共に用量反応関係を把握する研究を行った[7-41]。その結果を DDT と DDE とで比較したところ、イニシエーター活性は DDE の方が強く、プロモーター活性は DDT の方が強いことが示された。この結果と、DDE は DDT よりも 100 倍程度高い濃度で肝臓中に蓄積するという 7-4-3 における結果とから、本評価では発がんイニシエーションには DDE のみが作用するとして DDE について放射線等価係数を決定して評価を行った。

図 7-24 に篠本の研究における、DDE 曝露によって BALB/3T3 細胞に誘発される形質転換頻度の用量反応関係[7-41]を、図 7-25 に Little の研究における、X 線曝露によって BALB/3T3 細胞に誘発される形質転換頻度の



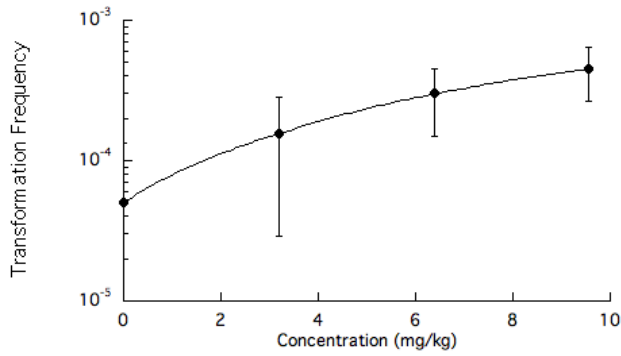


図 7-24 DDE によるトランスフォーメーションアッセイ  
(篠本[7-41])

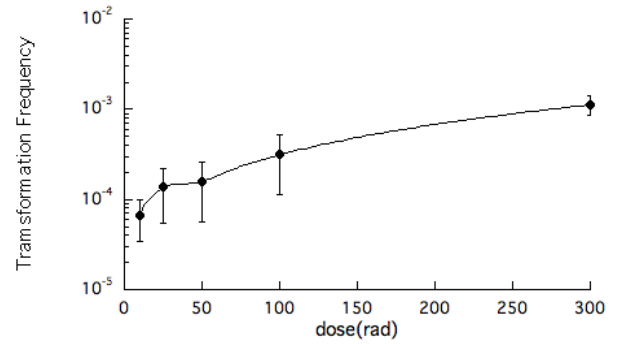


図 7-25 X 線によるトランスフォーメーションアッセイ  
(Little J.B.[7-42])

用量反応関係[7-42]を、それぞれ示す。なお、横軸はそれぞれの曝露量を示し、縦軸は生細胞 1 細胞あたりの形質転換頻度である。これらの形質転換頻度の用量反応関係を、Chapter 3-6 と同様に LQ モデル及び Weibull モデルを用いて回帰した。得られた回帰式を式(7-41)~(7-44)に示す。

#### LQ モデル

$$\text{DDE (図 7-24)} : y = 1 - \exp\left\{-(4.80 \times 10^{-5} C_{DDE} - 5.44 \times 10^{-8} C_{DDE}^2)\right\} \quad (R^2 = 0.98) \quad (7-41)$$

$$\text{X 線 (図 7-25)} : y = 1 - \exp\left\{-(3.19 \times 10^{-6} D_X - 1.86 \times 10^{-9} D_X^2)\right\} \quad (R^2 = 0.99) \quad (7-42)$$

#### Weibull モデル

$$\text{DDE (図 7-24)} : y = 1 - \exp(-4.89 \times 10^{-5} C_{DDE}^{0.988}) \quad (R^2 = 0.98) \quad (7-43)$$

$$\text{X 線 (図 7-25)} : y = 1 - \exp(-2.65 \times 10^{-5} D_X^{1.06}) \quad (R^2 = 0.99) \quad (7-44)$$

ここで、

$y$  : 形質転換頻度[-]

$C_{DDE}$  : DDE 濃度[mg/kg]

$D_X$  : X 線の線量[Gy]

である。

これらの回帰式を用いて、形質転換頻度  $0 \sim 10^{-3}$  の範囲で、ある形質転換頻度に対応する DDE 濃度と X 線量を求めた。その結果を図 7-26,7-27 に示す。また、図 7-26,7-27 のそれぞれを原点を通る直線で回帰したところ、式(7-45),(7-46)に示す回帰式を得た。これらの回帰式では非常に高い相関係数が得られたため、DDE の放射線等価係数として各式の一次係数を採用した。すなわち、LQ モデルにより算出した DDE の放射線等価係数を  $0.141[\text{Gy}/(\text{mg}/\text{kg})]$ 、Weibull モデルによる放射線等価係数を  $0.137[\text{Gy}/(\text{mg}/\text{kg})]$  と決定した。

#### LQ モデル (図 7-26)

$$D_X = 0.141 \cdot C_{DDE} \quad (R^2 = 1.0) \quad (7-45)$$

#### Weibull モデル (図 7-27)

$$D_X = 0.137 \cdot C_{DDE} \quad (R^2 = 1.0) \quad (7-46)$$

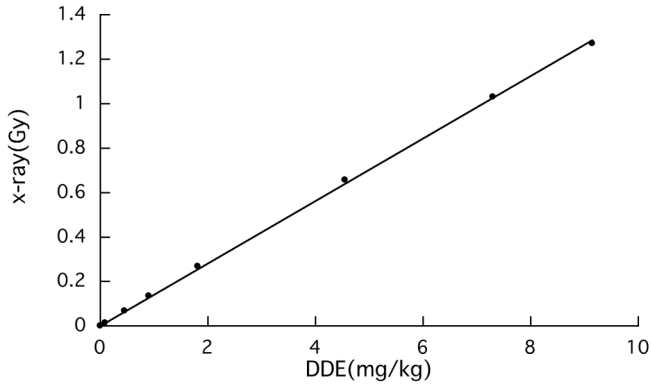


図 7-26 DDE 濃度と放射線量との関係 (LQ モデル)

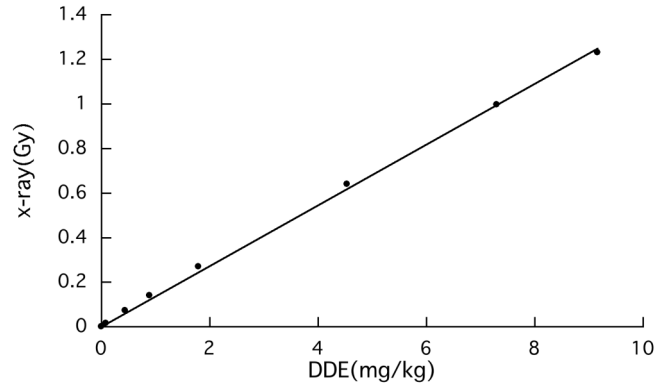


図 7-27 DDE 濃度と放射線量との関係 (Weibull モデル)

#### 7-4-5. DDT 誘発肝臓がんリスク評価

DDT 誘発肝臓がんリスクを、以下の式(7-47)に基づいて評価した。

$$\begin{aligned} R_{DDT} &= D_{ex} \cdot R_{radiation} \cdot P \\ &= \frac{D_{in}}{OC_{Li}} R_{radiation} \cdot P \\ &= \frac{C_{DDE} \cdot REC_{DDE} \cdot DDREF}{OC_{Li}} R_{radiation} \cdot P \end{aligned} \quad (7-47)$$

ただし、

$R_{DDT}$  : DDT 誘発肝臓がんリスク

$R_{radiation}$  : 放射線のリスク係数[-/Gy]

$D_{ex}$  : 全身等価放射線量[Gy]

$D_{in}$  : 肝臓中等価放射線量[Gy]

$OC_{Li}$  : 肝臓の臓器分配係数[-]

$C_{DDE}$  : DDE の肝臓中濃度[mg/kg]

$REC_{DDE}$  : DDE の放射線等価係数[Gy/(mg/kg)]

$DDREF$  : 線量・線量率効果係数[-]

$P$  : DDT のプロモーター活性係数[-]

である。

なお、ここでも、肝臓の臓器分配係数  $OC_L$  としては 0.1MeV~0.25MeV の放射線に対する文献値 0.2-1.4[7-30] を用い、線量・線量率効果係数  $DDREF$  は ICRP の推奨値 2[7-31]を採用した。また、放射線のリスク係数  $R_{radiation}$  としては ICRP による肝臓に対するがん死亡生涯リスク  $1.5 \times 10^{-3}$  [Sv]を採用した[7-19]。なお、X 線の線質係数は 1 であり、1Gy=1Sv として計算を行った。加えて、プロモーター活性係数  $P$  としては篠本の研究において DDT のプロモーター活性を測定したトランスフォーメーションアッセイの結果の回帰式(7-48)を用い、肝臓中 DDT 及び DDE 濃度は 7-4-3 で述べた通り 42 歳時点での計算値を採用した。評価結果を表 7-5 に示す。

$$P = (1 + 0.199 \cdot C_{DDT}) \quad (7-48)$$

この評価値の妥当性を検証するために、U.S.EPA の示す DDT の Slope Factor との比較を行う。表 7-5 に示したリスク評価値を、PBPK モデルに用いた経口摂取量で割ることにより、Slope Factor 値を算出し、U.S.EPA の示す Slope Factor 値 0.34[7-7]と比較した。その結果を表 7-6 に示す。計算の結果、本評価における Slope Factor 値は 0.108-0.776 となり、U.S.EPA による SF の約 3 分の 1 から 2.25 倍程度の値となった。

表 7-5 放射線等価係数による DDT の肝臓がんリスク評価結果

曝露シナリオ	肝臓がんリスク [-]	
	LQ	Weibull
Min	$6.53 \times 10^{-6}$ - $4.57 \times 10^{-5}$	$6.83 \times 10^{-6}$ - $4.44 \times 10^{-5}$
Avg	$1.08 \times 10^{-5}$ - $7.55 \times 10^{-5}$	$1.13 \times 10^{-5}$ - $7.34 \times 10^{-5}$
Max	$1.11 \times 10^{-5}$ - $7.76 \times 10^{-5}$	$1.16 \times 10^{-5}$ - $7.54 \times 10^{-5}$

表 7-6 Slope Factor による本評価の検証結果

曝露シナリオ	Slope Factor [-/mg/kg/day]		
	LQ	Weibull	U.S.EPA
Min	0.109-0.758	0.114-0.737	
Avg	0.108-0.755	0.113-0.734	0.34
Max	0.111-0.776	0.116-0.754	

## 7-5 放射線等価係数の適用可能性についての考察

ここでは、本研究で行ったベンゼン誘発白血病、ACN 誘発肺がん、DDT 誘発肝臓がんそれぞれのリスク評価の結果から、放射線等価係数を用いたリスク評価法の適用可能性について検討する。

まず、ベンゼン誘発白血病のリスク評価においては、ヒト正常骨髄細胞を用いた染色体異常試験の結果からベンゼン、CAT, HQ の放射線等価係数を決定し、それぞれの骨髄中濃度の計算結果と組み合わせることによりリスク評価を行った。その結果、大気中ベンゼン 1ppm に対して  $7.3 \times 10^{-4}$ - $2.0 \times 10^{-3}$ 、大気中ベンゼン  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  に対して  $2.5 \times 10^{-7}$ - $6.7 \times 10^{-7}$  とのリスク値を得た。この結果は、U.S.EPA による大気中ベンゼン 1ppm に対するリスク

値  $7.1 \times 10^{-3}$  -  $2.5 \times 10^{-2}$  と比べて 10 倍程度の過小評価であるものの、その元データとして用いられた Crump による Pliofilm™ コホート研究による報告値の範囲に収まっており、また、Chapter 4 で述べたように染色体異常試験法の改善や複合曝露効果の考慮等未だ改善の余地もあり、現時点の知見を統合した *in vitro* 試験に基づく積み上げ型のリスク評価としては良好な評価値が得られたと言える[7-1,2]。これは白血病というエンドポイントに対してその標的臓器である骨髄のヒト正常細胞を用い、また現時点で白血病発症との関連が最も強く示唆されている染色体異常を指標とすることで、ベンゼン誘発白血病に特異的な評価手法を取ったため、発症との関連を保った比較が実現できたためと考えられる。今後、メルファランやエトポシド等、白血病を誘発することが知られる他の物質への適用例を蓄積することで、本手法を白血病一般に適用する可能性について探ることが望まれる。

また、DDT 誘発肝臓がんリスク評価においては、より一般的な実験系としてマウス由来細胞 BALB/3T3 を用いたトランスフォーメーションアッセイの報告例[7-41, 42]を比較することで DDE の放射線等価係数を決定し、DDT のプロモーター活性を考慮して DDT 及び DDE の肝臓中濃度計算結果と組み合わせることでリスク評価を行った。その結果、経口摂取に対する Slope Factor として 0.108-0.776 との見積もりを得た。この値は U.S.EPA による Slope Factor 値 0.34 の約 3 分の 1 から 2.25 倍程度の値であり、また、U.S.EPA が Slope Factor の算出に用いた元データにおける Slope Factor 値 0.082-1.04 の範囲内に収まっており、極めて良好な評価値であったと言える[7-37]。この結果は、細胞の形質転換が DDT 誘発肝臓がんのリスクを評価するにあたって有用な指標たり得ることを示唆しており、他の物質の誘発する肝臓がんリスクや、肝臓がん以外の固形がんのリスク評価への幅広い適用が期待される。

一方、ACN 誘発肺がんリスク評価においては、マウス由来細胞 C3H/10T1/2 を用いたトランスフォーメーションアッセイの報告例[7-16~7-18]を比較することで ACN の放射線等価係数を決定し、肺組織中濃度の計算結果と組み合わせることでリスク評価を行った。その結果、ACN により誘発される肺がんの生涯死亡リスクは、大気中 ACN  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  に対して  $4.4 \times 10^{-9}$  -  $2.2 \times 10^{-8}$  となった。このリスク計算値は、U.S.EPA によるユニットリスク値  $6.8 \times 10^{-5}$  [7-7] と比べて 3,000 分の 1 から 15,000 分の 1 と、極めて小さな値となった。この評価値の乖離の一因としては、U.S.EPA によるユニットリスク値が肺がん以外の呼吸器がんも含めた評価であることや、あるいは U.S.EPA のユニットリスク値の計算に用いられた O'Berg の疫学研究[7-6]は追跡研究によりその有意性に疑問が持たれていることなどが考えられるが、本評価には未だ改善し得る点が認められるため、以下に評価値の改善に向けた改良点を挙げる。

まず、本評価では PBPK モデルの構築にあたり、ヒトに関する ACN の体内動態情報が十分に得られなかったため、パラメータの設定は Sweeney らの用いたラットからの外挿手法[7-15]に頼っている。また、肺組織の組織、血液分配係数については *in vitro* のデータ等もなく、灌流の豊富な組織と同じ値を仮定した評価となっている。例えば肺組織の組織、血液分配係数すなわち  $Pa_{Lu}$  を 10 倍大きな値とした場合、肺組織中 ACN 濃度は  $4.7 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL}$  と、ほぼ 10 倍の計算値となり、肺組織、血液分配係数が評価結果に大きな影響を及ぼすことが考えられる。従って、肺組織を用いた *in vitro* データやヒトの体内動態情報、あるいは実験動物における体内動態情報を更に収集し、より正確な肺組織中濃度を得る必要がある。また、本評価では肺組織中 CEO 濃度の計算値が ACN と比べ 40 分の 1 程度であったことなどから、発がんへの寄与物質として ACN のみを想定したが、CEO を対象としたトランスフォーメーションアッセイを行うことで CEO の毒性に関しても実験的に把握することが望ましい。

これらの追加検討を行うことで評価値の改善が予想されるが、本研究の結果からは、そもそも ACN の肺がんリスク評価にトランスフォーメーションアッセイに基づく放射線等価係数が適用できない可能性が無視で

きない。放射線及び化学物質の誘発する肺がんの共通点や相違点を判断し得る発症機構の詳細についての知見は未だ不足しているが、ACN と X 線とでは、形質転換誘発と肺がん発症との関連性が異なる可能性が考えられる。また、ACN の健康影響としては特に実験動物に対しては脳腫瘍が顕著であり、ヒトに対しても神経影響が盛んに報告されている。しかし放射線に関しては脳腫瘍や神経影響についての定量的な評価は確立されておらず、放射線等価係数はそうした影響の評価には適用できないという限界を持つ。その様な場合には、数理発がんモデルを構築する等、別の手段で *in vitro* の影響と *in vivo* の影響とを関連付ける必要がある。更に、本章での DDT 及び ACN のリスク評価のように動物細胞によるトランスフォーメーションアッセイ等の比較的非特異的な指標を用いる場合、毒性の特異性、すなわち標的臓器の決定は基本的に体内動態の差異を反映することになる。従って体内動態を忠実に再現することが一層重要になる上に、臓器特異的な組織応答が重大な寄与を示すエンドポイントに対してはこうした指標を用いることはできず、標的臓器の機能をモデル化し得る実験系を構築する必要があると考えられる。

以上のように、本研究で行ったベンゼン及び DDT のリスク評価の結果は放射線等価係数を用いたリスク評価法の妥当性を支持する結果であると考えられるが、ACN のリスク評価結果は放射線等価係数の適用限界を示す結果であるとも考えられ、本研究で得られた知見のみでは、放射線等価係数によるリスク評価の妥当性とその適用限界について具体的な結論を出すには未だ充分でない。最後に、本評価法の適用可能性についてより具体的な知見を得るために有効と考えられる今後の主な展望を 2 点挙げる。

まず 1 点目には、白血病や肝臓がん等、特定のエンドポイントに対して複数の原因物質を対象とした評価を行うことである。特に白血病については、ベンゼン以外にも、メルファランやエトポシド等、抗癌剤による 2 次発がんが広く知られていることから、臨床情報に基づくヒトに対する毒性情報が豊富に蓄積されており、追加検討を行うには最適対象であると言える。こうした検討を行うことで、放射線等価係数によるリスク評価が、ベンゼン誘発白血病や DDT 誘発肝臓がん等の、極めて限定的な特殊な事例のみに適用し得るのか、それとも白血病等の特定のエンドポイントに対しては比較的広く適用可能なのか、といった点を判断し得る知見の獲得が期待できる。また、併せて 2 点目として、1 つの対象物質につき複数の評価指標、すなわちバイオマーカーを用いた評価を適用することで、バイオマーカーのエンドポイントへの特異性と一般性、そして適用可能性についての考察が深まると考えられる。

## 参考文献

- 7-1. U.S.EPA(Environmental Protection Agency)(2008): *Benzene (CASRN 71-43-2), IRIS, Environmental Protection Agency*, <http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm>, Accessed on Oct. 12<sup>th</sup>, 2010.
- 7-2. Crump K.S.(1994): *Risk of benzene-induced leukemia: a sensitivity analysis of the pliofilm cohort with additional follow-up and new exposure estimates*, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 42(2), 219-42.
- 7-3. 環境省(2008): リスクコミュニケーションのための化学物質ファクトシート: アクリロニトリル, <http://ceis.sppd.ne.jp/fs2008/factsheet/data/1-009.html> (Accessed Dec 9th, 2010).
- 7-4. 化学物質評価研究機構(1997): 化学物質安全性 (ハザード) 評価シート: アクリロニトリル, [http://qsar.cerij.or.jp/SHEET/F96\\_03.pdf](http://qsar.cerij.or.jp/SHEET/F96_03.pdf) (Accessed Dec 9th, 2010).
- 7-5. Quast J.F.(2002): *Two-year toxicity and oncogenicity study with acrylonitrile incorporated in the drinking water of rats*, *Toxicology Letters*, 132(3), 153-96.
- 7-6. O'Berg M.T.(1980): *Epidemiologic study of workers exposed to acrylonitrile*, *Journal of Occupational Medicine*, 22(4), 245-52.

- 7-7. U.S.EPA(2003): *Acrylonitrile (CASRN 107-13-1)/ IRIS/ US EPA*, <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0206.htm> (Accessed Dec 9th, 2010).
- 7-8. 新エネルギー・産業技術総合開発機構(2005): 化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0 No.64 アクリロニトリル, <http://www.safe.nite.go.jp/management/data/64/initrisk.html> (Accessed Dec 9th, 2010).
- 7-9. Ahmed A.E., Farooqui M.Y., Upreti R.K. and El-Shabrawy O.(1983): *Comparative toxicokinetics of 2,3-14C-and 1-14C-acrylonitrile in the rat*, *Journal of Applied Toxicology*, 3(1), 39-47.
- 7-10. Fennell T.R., Kedderis G.L. and Sumner S.C.(1991): *Urinary metabolites of [1,2,3-13C]acrylonitrile in rats and mice detected by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy*, *Chemical Research in Toxicology*, 4(6), 678-87.
- 7-11. Kedderis G.L., Sumner S.C., Held S.D., Batra R., Turner M.J. Jr., Roberts A.E. and Fennell T.R.(1993): *Dose-dependent urinary excretion of acrylonitrile metabolites by rats and mice*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 120(2), 288-97.
- 7-12. Müller G., Verkoyen C., Soton N. and Norpoth K.(1987): *Urinary excretion of acrylonitrile and its metabolites in rats*, *Archives of Toxicology*, 60(6), 464-6.
- 7-13. Roberts A.E., Lacy S.A., Pilon D., Turner M.J. Jr. and Rickert D.E.(1989): *Metabolism of acrylonitrile to 2-cyanoethylene oxide in F-344 rat liver microsomes, lung microsomes, and lung cells*, *Drug Metabolism and Disposition*, 17(5), 481-6.
- 7-14. Kedderis G.L., Teo S.K., Batra R., Held S.D. and Gargas M.L.(1996): *Refinement and verification of the physiologically based dosimetry description for acrylonitrile in rats*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 140(2), 422-35.
- 7-15. Sweeney L.M., Gargas M.L., Strother D.E. and Kedderis G.L.(2003): *Physiologically based pharmacokinetic model parameter estimation and sensitivity and variability analyses for acrylonitrile disposition in humans*, *Toxicology Science*, 71(1), 27-40.
- 7-16. Banerjee S. and Segal A.(1986): *In vitro transformation of C3H/10T1/2 and NIH/3T3 cells by acrylonitrile and acrylamide*, *Cancer Letters*, 32(3), 293-304.
- 7-17. Terzaghi M. and Little J.B.(1976): *X-radiation-induced transformation in a C3H mouse embryo-derived cell line*, *Cancer Research*, 36(4), 1367-74.
- 7-18. Han A. and Elkind M.M.(1979): *Transformation of mouse C3H/10T1/2 cells by single and fractionated doses of X-rays and fission-spectrum neutrons*, *Cancer Research*, 39(1), 123-30.
- 7-19. ICRP(1990): *ICRP publication 60: 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*, Elsevier Science.
- 7-20. Gargas M.L., Andersen M.E., Teo S.K., Batra R., Fennell T.R. and Kedderis G.L.(1995): *A physiologically based dosimetry description of acrylonitrile and cyanoethylene oxide in the rat*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134(6), 185-94.
- 7-21. Brown R.P., Delp M.D., Lindstedt S.L., Rhomberg L.R. and Beliles R.P.(1997): *Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models*, *Toxicology and Industrial Health*, 13(4), 407-84.
- 7-22. Rowell N.P., McCready V.R., Cronin B., Pepper J., Higley B., Burke J.F. and Tyrrell D.A.(1989): *99Tcm-labelled meso-HMPAO and glutathione content of human lung tumours*, *Nuclear Medicine Communications*, 10(7), 503-8.
- 7-23. ICRP(1975): *Report of the Task Group on Reference Man*. ICRP No.23, Pergamon Press.

- 7-24. Delp M.D., Manning R.O., Bruckner J.V. and Armstrong R.B.(1991): *Distribution of cardiac output during diurnal changes of activity in rats*, *American Journal of Physiology*, 261(5 Part 2), H1487-93.
- 7-25. Kedderis G.L. and Held S.D.(1998): *Refinement of human dosimetry description for acrylonitrile (ACN)*, *Toxicological Sciences*, 42S, 142.
- 7-26. Teo S.K., Kedderis G.L. and Gargas M.L.(1994): *Determination of tissue partition coefficients for volatile tissue-reactive chemicals: acrylonitrile and its metabolite 2-cyanoethylene oxide*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 128(1), 92-6.
- 7-27. Kedderis G.L., Batra R. and Koop D.R.(1993): *Epoxidation of acrylonitrile by rat and human cytochromes P450*, *Chemical Research in Toxicology*, 6(6), 866-71.
- 7-28. Kedderis G.L. and Batra R.(1993): *Species differences in the hydrolysis of 2-cyanoethylene oxide, the epoxide metabolite of acrylonitrile*, *Carcinogenesis*, 14(4), 685-9.
- 7-29. Yates J.M., Fennell T.R., Turner M.J. Jr., Recio L. and Sumner S.C.(1994): *Characterization of phosphodiester adducts produced by the reaction of cyanoethylene oxide with nucleotides*, *Carcinogenesis*, 15(2), 277-83.
- 7-30. ICRP(1989): 外部放射線に対する放射線防護に用いるための換算係数, *Japan Radioisotope Association*.
- 7-31. ICRP(2008): *ICRP publication 103: The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*, Elsevier Science.
- 7-32. Paul S.(1987): *Perception of Risk*, *Science*, 236, 280-5.
- 7-33. シツコワ・リヤザノフ (訳: 松藤元) (1977): 農薬の衛生学と毒性学, 講談社サイエンティフィック.
- 7-34. 井上哲男編(1999): 最新農薬学, 廣川書店.
- 7-35. 植村振作, 川村宏, 辻万千子, 富田重行, 前田静夫(1992): 農薬毒性の事典, 三省堂.
- 7-36. 若月俊一, 松島松翠, 安藤満(1989): 農薬の毒性と健康影響, 公害研究対策センター.
- 7-37. U.S.EPA(2005): *p,p'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) (CASRN 50-29-3)/ IRIS/ US EPA*, <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0147.htm> (Accessed Dec 9th, 2010).
- 7-38. IARC(1991): *DDT AND ASSOCIATED COMPOUNDS*, *IARC Monographs*, 53, 179-249.
- 7-39. 菱川絢子(2002): 日本とインドにおける DDTs の健康リスクに関する研究, 京都大学大学院工学研究科修士論文.
- 7-40. 深見学史(2006): 数理発がんモデルを用いたリスク評価枠組みの構築, 京都大学大学院工学研究科修士論文.
- 7-41. 篠本祐介(2008): *In vitro* トランスフォーメーションアッセイの発がんリスク評価への適用, 京都大学大学院工学研究科修士論文.
- 7-42. Little J.B.(1979): *Quantitative studies of radiation transformation with the A31-11 mouse BALB/3T3 cell line*, *Cancer Research*, 39(5), 1474-80.
- 7-43. You L., Gazi E., Archibeque-Engle S., Casanova M., Conolly R.B. and Heck H.A.(1999): *Transplacental and lactational transfer of p,p'-DDE in Sprague-Dawley rats*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157(2), 134-44.
- 7-44. Mussalo-Rauhamaa H.(1991): *Partitioning and levels of neutral organochlorine compounds in human serum, blood cells, and adipose and liver tissue*, *The Science of the Total Environment*, 103(2-3), 159-75.
- 7-45. Morgan D. and Roan C.C. (Hayes W.J.Jr. Ed)(1974): *The metabolism of DDT in man*, *In Essays in Toxicology*, 5, 39-97.

## Chapter 8 結論

### 8-1 本研究の結論

本研究では、動物実験主体の従来の事後的リスク評価法に代わる、新しい簡便かつ予見的なリスク評価法として、放射線等価係数を用いたリスク評価法を提案し、その確立を目標とした検討を行ってきた。特にベンゼンの誘発する白血病リスク評価について詳しく検討した他、ACN 誘発肺がん、DDT 誘発肝臓がんについても検討し、放射線等価係数の適用可能性を探った。以下に、本論文各章の内容をまとめて記す。

まず Chapter 1 では、本研究で提案する放射線等価係数を用いたヒト健康リスク評価法の意義を説き、その確立に向けて本研究の目的を設定した。

次に Chapter 2 では、後の章で行う、ヒト正常骨髄細胞を用いた染色体異常試験において必須となる細胞培養条件について検討を行った。その結果、以下の知見を得た。

1. ヒト正常骨髄細胞に対する最適培養条件として表 2-1 に示した条件 4, すなわち培養液として 1%(v/v)の StemSpan® CC100 を添加した無血清培地 StemSpan® SFEM を用いた、初期細胞密度  $1.7 \times 10^4$  cells/mL での培養という条件を見出し、実際に培養 6 日目に約 15.9 倍という十分な増殖を確認した。
2. 上述の最適培養条件によって 6 日間培養した細胞を対象としてフローサイトメトリーにより分化解析を行い、14.2%という高頻度で造血細胞群である CD34<sup>+</sup>細胞が存在することを確認し、造血機能の観点からヒト骨髄における毒性を評価するにあたって適切な培養状態であることを確認した。
3. 同じく培養後の細胞を対象として代謝酵素 MPO の含有量を測定し、MPO 産生が確認されている HL-60 細胞における報告値  $310.3 \text{ pmol}/10^6 \text{ cells}$ [8-1]を上回る含有量測定値  $872 \pm 406 \text{ pmol}/10^6 \text{ cells}$  (n=5) を得た。すなわち代謝機能の観点からも適切な培養状態であることが確認されたとと言える。

Chapter 3 では、Chapter 2 で決定した最適培養条件に従って培養したヒト正常骨髄細胞を用いて染色体異常試験を行い、その結果得られた用量反応関係をベンゼンと放射線とで比較することでベンゼンの放射線等価係数を決定した。その結果、ベンゼン代謝物に対する放射線等価係数は、LQ モデルに基づいて用量反応関係の回帰を行った場合、CAT で  $0.486[\text{Gy}/\mu\text{M}]$ , HQ で  $0.358[\text{Gy}/\mu\text{M}]$ , CAT と HQ の複合曝露で  $0.301[\text{Gy}/\mu\text{M}]$  となり、Weibull モデルに基づいた場合、CAT で  $0.462[\text{Gy}/\mu\text{M}]$ , HQ で  $0.429[\text{Gy}/\mu\text{M}]$ , CAT と HQ の複合曝露で  $0.379[\text{Gy}/\mu\text{M}]$  となった。また、CAT と HQ の複合曝露に対する放射線等価係数は、それぞれの単独曝露に対する放射線等価係数の単純和よりも小さな値となった。この結果は CAT と HQ の複合曝露による相乗的な影響を報告する既存の研究報告[8-2~8-4]とは矛盾するものであった。しかしながら、ベンゼン代謝物  $6\mu\text{M}$  の曝露による染色体異常の発生頻度を見るに、複合曝露により単独曝露の単純和よりも高頻度で染色体異常が誘発されており、低濃度域の解析の不確実性を示唆する結果であると考えられ、更に低濃度域での曝露条件による追加検討が望まれる。

続いて Chapter 4 では、PBPK モデルを用いたベンゼンの体内動態評価を行い、ベンゼンの吸入曝露に対応するベンゼン及び代謝物の骨髄中濃度を計算した。その結果、骨髄中濃度の計算値は、大気中濃度 1ppm のベンゼン曝露に対しては、ベンゼンで  $1.3 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ , CAT で  $4.2 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ , HQ で  $2.3 \times 10^{-1} \mu\text{M}$  となり、大気中濃度  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  のベンゼン曝露に対しては、ベンゼンで  $4.4 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ , CAT で  $1.4 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ , HQ で  $7.8 \times 10^{-5} \mu\text{M}$  となった。



また、ここで得た骨髓中ベンゼン及び代謝物濃度と、Chapter 3 で得た放射線等価係数とを用いてベンゼン誘発白血病リスクを評価した。その結果、ベンゼンにより誘発される白血病の生涯死亡リスクは、大気中ベンゼン 1ppm に対して  $7.3 \times 10^{-4}$ - $2.0 \times 10^{-3}$ 、大気中ベンゼン  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  に対して  $2.5 \times 10^{-7}$ - $6.7 \times 10^{-7}$  となった。この結果は、U.S.EPA による大気中ベンゼン 1ppm に対するリスク値  $7.1 \times 10^{-3}$ - $2.5 \times 10^{-2}$  と比べて 10 倍程度の過小評価であるものの、その元データとして用いられた、Crump による Pliofilm™ コホート研究による報告値の範囲に収まっており、*in vitro* 試験に基づく積み上げ型のリスク評価としては良好な評価値が得られたと言え、放射線等価係数を用いたリスク評価の妥当性がある程度示されたと言える[8-5,6]。

Chapter 5 では、CAT あるいは  $\gamma$  線を曝露したヒト正常骨髓細胞を対象としてマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現変動解析を行い、その結果をリスク評価に適用する可能性について検討した。その結果、白血病リスクを評価するにあたっての有力なマーカー候補として BCL2 を中心とした生化学的パスウェイ関連遺伝子群を見出した。

また、3 種類のドナーに由来する細胞間での遺伝子発現パターンを比較することで、CAT 曝露に対する生体応答の個人差を定量的に表現することを試みた。ここでは既存の白血病メカニズムについての研究報告[8-7]を参照して白血病関連遺伝子群を抽出し、それらの発現変動パターンの差異に基づいて生体応答の個人差の定量評価法として Sensitivity Index なる感受性指標を提案した。本指標は疫学情報[8-8]との一致が見られたもののその妥当性の検証には未だ長期的な検証を要するものである。しかしながらリスク評価への将来的な適用例や、スクリーニング評価としてのより早い段階での適用例等も考えられ、従来用いられてきた不確実係数を詳細な分子生物学的根拠に基づいた総合的な感受性指標として再設定する手法を提案する点で意義深いものである。

Chapter 6 では、タンパク質の発現変動パターンをリスク評価に適用する可能性について検討することを目的として、X 線、CAT、HQ を曝露したヒト正常骨髓細胞からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動による網羅的な発現変動解析を行った。その結果を比較した結果、ベンゼン代謝物曝露と X 線照射に共通してその発現量を変動させたタンパク質として Protein SET 及び Cofilin-1 を見出し、特に SET-PP2A-JNK パスウェイ関連遺伝子群及びタンパク質群の白血病リスク評価におけるマーカーとしての有用性が示唆された。

また、この結果を Chapter 5 で示した遺伝子発現変動解析の結果と比較した所、遺伝子発現変動の観点からも SET-PP2A-JNK パスウェイ関連機構とベンゼン及び放射線誘発白血病の発症との関連が示唆され、より定量的な試験を用いた追加検討が強く望まれる。

Chapter 7 では、Chapter 2~Chapter 6 までのベンゼン誘発白血病リスク評価に関する検討を総括し、本研究で提案する放射線等価係数を用いたリスク評価の概要と将来像について整理して述べた。

また、ACN 誘発肺がん及び DDT 誘発肝臓がんの各々を対象として放射線等価係数を用いたリスク評価を試みた。その結果、DDT については経口摂取に対する Slope Factor として 0.108-0.776 との見積もりを得た。この値は U.S.EPA による Slope Factor 値 0.34 の約 3 分の 1 から 2.25 倍程度の値であり、また、U.S.EPA が Slope Factor の算出に用いた元データにおける Slope Factor 値 0.082-1.04 の範囲内に収まっており、極めて良好な評価値であったと言える[8-9]。すなわち細胞の形質転換が DDT 誘発肝臓がんのリスクを評価するにあたって有用な指標たり得ることを示唆しており、他の物質の誘発する肝臓がんリスクや、肝臓がん以外の固形がんのリスク評価への幅広い適用が期待される。

その一方で、ACNについては大気中 ACN  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  に対して  $4.4\times 10^{-9}$ - $2.2\times 10^{-8}$  という肺がん生涯死亡リスクを得た。この値は U.S.EPA によるユニットリスク値  $6.8\times 10^{-5}$  [8-10] と比べて 3,000 分の 1 から 15,000 分の 1 と、極めて小さな値となった。この原因は何点か考えられるが、ACN の肺がんリスク評価にトランスフォーメーションアッセイに基づく放射線等価係数が適用できない可能性が無視できず、放射線等価係数の適用限界を示す結果であるとも考えられる。

本研究の知見のみでは放射線等価係数によるリスク評価の妥当性とその適用限界について具体的な結論を出すには未だ充分でないため、様々な物質を対象とした評価を蓄積して追加検討を行い、放射線等価係数によるリスク評価法の適用可能性についての知見を深めることが期待される。

## 8-2 今後の課題と展望

本論文中では、放射線等価係数を用いた健康リスク評価法の確立を目指して、主にベンゼン誘発白血病リスクを対象として詳しく検討を行った。また、実用に向けた適用可能性の検討として、ACN 誘発肺がん、DDT 誘発肝臓がんについても放射線等価係数によるリスク評価を行った。しかし本研究は未だ新しいリスク評価法の開発段階にあり、本評価法の妥当性と適用限界を具体的に明らかにするためには、7-5 でも述べた様に、今後も持続的な検討が必要である。放射線等価係数を用いた健康リスク評価法を確立して実用化するために、今後必要と考えられる検討事項を以下に挙げる。

1. 白血病等の特定のエンドポイントに着目し、複数の原因物質を対象として放射線等価係数による評価を行い、結果を比較することで適用可能性についての考察を深める
2. DDT 誘発肝臓がんやベンゼン誘発白血病等、特定の物質の特定のエンドポイントに着目し、複数の評価指標を用いた評価を行い、結果を比較することバイオマーカーのエンドポイントへの特異性と一般性、そして適用可能性についての考察を深める
3. 今後、各対象物質の評価にあたっては、代謝物同士の複合曝露効果に注意し、特に相乗的な影響が報告されている物質群については複合曝露条件を再現した実験を行うことで複合曝露効果をリスク評価に組み込み、より妥当な評価を目指す

以上の検討を続けることで、本評価法の適用範囲とその限界が明らかとなり、適用可能な対象については妥当な評価が実現できると期待される。万能な評価ツールは実現し得ないため、本評価にも当然ながら多くの限界が存在することが予想されるが、本研究におけるベンゼンや DDT の様に信頼性の高い評価が実現できる対象も少なからず存在すると考えられ、本評価は適用範囲を具体的に明らかにすることで実用に足る枠組みとなり得ると期待できる。本研究で提案する評価体系を確立することができれば、従来の様な大規模な動物実験に頼らず、簡易な細胞実験によるヒト健康リスク評価が実現でき、疫学情報のない新規物質に対しても迅速かつ予見的なリスク評価が可能になると期待できる。また、本研究は、本評価法自体の妥当性を示すことのみならず、研究過程を通じて他の予見的リスク評価法の開発を促し、事後的リスク評価からの転換を図る点でも意義深いと考える。

## 参考文献

- 8-1. Noguchi Y.(2001): *Evaluation of oxidative DNA damage induced by benzene metabolite hydroquinone*, Master's thesis at Kyoto University Graduate School of Engineering.

- 8-2. Robertson M.L., Eastmond D.A. and Smith M.T.(1991): *Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes*, *Mutation Research*, 249(1), 201-9.
- 8-3. Levay G. and Bodell W.J.(1992): *Potentiation of DNA adduct formation in HL-60 cells by combinations of benzene metabolites*, *Proceedings of the National Science of the U.S.A.*, 89(15), 7105-9.
- 8-4. Stillman W.S., Varella-Garcia M. and Irons R.D.(1999), *The benzene metabolites hydroquinone and catechol act in synergy to induce dose-dependent hypoploidy and -5q31 in a human cell line*, *Leukemia and Lymphoma*, 35(3-4), 269-81.
- 8-5. U.S.EPA(Environmental Protection Agency)(2008): *Benzene (CASRN 71-43-2), IRIS, Environmental Protection Agency*, <http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm> (Accessed Oct 12th, 2010).
- 8-6. Crump K.S.(1994): *Risk of benzene-induced leukemia: a sensitivity analysis of the pliofilm cohort with additional follow-up and new exposure estimates*, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 42(2), 219-42.
- 8-7. Yoon B.I., Li G.X., Kitada K., Kawasaki Y., Igarashi K., Kodama Y., Inoue T., Kobayashi K., Kanno J., Kim D.Y., Inoue T. and Hirabayashi Y.(2003): *Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue*, *Environmental Health Perspectives*, 111(11), 1411-20.
- 8-8. Parkin D.M., Whelan S.L., Ferlay J., Raymond L. and Young J.(1997): *Cancer Incidence in Five Continents: Volume VII, IARC Scientific Publications No.143*.
- 8-9. U.S.EPA(2005): *p,p'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) (CASRN 50-29-3)/ IRIS/ US EPA*, <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0147.htm> (Accessed Dec 9th, 2010).
- 8-10. U.S.EPA(2003): *Acrylonitrile (CASRN 107-13-1)/ IRIS/ US EPA*, <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0206.htm> (Accessed Dec 9th, 2010).

## 謝辞

本研究を進めるにあたって、森澤眞輔名誉教授、米田稔教授、中山亜紀准教授、松井康人講師、星原花絵秘書に多大なるご協力を賜りましたことを深く感謝致します。森澤先生には研究室配属当時から大きなテーマを与えていただき、また、いつもの確なご指導をいただき、ありがとうございました。先生の「specialist かつ generalist たれ」というお言葉はまさに私の理想とする研究者像を表しています。また、米田先生には常に私達学生立場に立ってお話をしていただけ、更には率先して超人的なスケジュールをこなされる先生を見る度に気が引き締まる思いをさせていただいております。私もいずれは日帰り海外出張という偉業を成し遂げたいと思います。松井先生にはいつもフランクに話しかけていただき、日常的なことから研究に関することまで、様々な話題について楽しくお話をさせていただきました。また、星原さんには煩雑な事務処理から私生活まで、多くの学生の面倒を一手に引き受けて下さり、研究室全体をサポートしていただきました。そして中山先生には研究室配属から今に至るまで、直属の指導教員として本当にお世話になりました。ご多忙中、時に優しく、時に厳しく常に気にかけていただき、どれだけ感謝しても足りません。研究面のみならず私生活に関しても絶えず甚大なお気遣いをいただき、本当にありがとうございました。中山先生にご指導いただいたことを肝に銘じ、これからの研究者としての道を歩んでいきたいと思っています。

また、弘前大学医学部宮越研究室の皆様には FACs 装置を、京都大学工学部西本研究室の皆様には X 線照射装置を、京都大学放射線生物研究センターの小林純也先生には放射線照射装置を、京都大学医学研究科の出口敦子先生にはマイクロアレイスキャナを、そして京都大学工学部旧内山研究室の皆様には二次元電気泳動装置及び試薬を提供していただきました。また、元京都大学医学部、大川克也先生、そして京都大学工学部、足立淳先生にはタンパク質の同定にお力添えをいただきました。更には、医薬基盤研究所の平山知子先生には染色体標本作製についてご教示いただき、また、カリフォルニア大学バークレー校の Martyn T. Smith 先生、Zhang Luoping 先生、そして PD の Zhiying Ji 博士には、FISH 法等の染色体解析技術についてご教示いただきました。皆様のお力添え無しには私の研究は成り立ちませんでした。また、学会発表や論文査読を通じて貴重なご意見をいただいた諸先生方にも発表の度に様々なご意見をいただきました。この場を借りて皆様に厚く御礼申し上げます。

そして、旧森澤研、現米田研に所属する学生の皆様には研究仲間として本当にお世話になりました。配属当初から数えて5年半、沢山の先輩、同回生、後輩、そして留学生の皆さま方に仲良くしていただきました。ありがとうございます。今後、研究室の皆さんに少しでも恩返しができるよう、精一杯努めさせていただきます。

最後になりましたが、家族の支えなくしては大学での研究生活は成り立ちませんでした。母に学位を取得して自立する姿を見せられなかったのは残念でなりませんが、今後も一層家族の絆を大切に生きていけたらと思います。また、妻、そして3月に生まれた我が子には、長年学生として支えてもらうばかりで迷惑をかけてしまいました。せめてこれからは家族が目一杯幸福な人生を送れるよう全力を尽くしたいと思います。

皆様、本当にありがとうございました。